

**VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
VERSCHIEDENER SEROTYPEN DES VIRUS
DER AVIÄREN INFEKTIOSEN BRONCHITIS
MIT HILFE DER SERUMNEUTRALISATION
UND HÄMAGGLUTINATIONSHEMMUNG**

CLEMENS KAUFHOLD

1986

Disbui. München
1987





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem
Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt
Aulendorf
Leiter: Ltd. Vet. Dir. Dr. B. Müller
vorgelegt über das

Institut für Geflügelkrankheiten
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. J. Kösters

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER
SEROTYPEN DES VIRUS DER AVIAREN INFEKTIOSEN
BRONCHITIS MIT HILFE DER SERUMNEUTRALISATION
UND HAMAGGLUTINATIONSHEMMUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Clemens Kaufhold

aus

Pfullendorf

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. J. Kösters

Korreferent: Prof. Dr. H.G. Buschmann

Tag der Promotion: 27. Februar 1987

Meiner Oma

Maria Schmid

Abkürzungen

AIB	Aviäre Infektiöse Bronchitis
AIBV	Virus der Aviären Infektiösen Bronchitis
EID ₅₀	mittlere Embryo infektiöse Dosis
g	math. Ausdruck der Erdbeschleunigung ($1\text{ g} = 9,8\text{ m/sec}^2$)
HA	Hämagglutination
HAH	Hämagglutinationshemmung
n. d.	nicht durchgeführt
NI	Neutralisationsindex
PBS	Dulbecco Phosphat-Puffer-Lösung (ohne Ca^{++} - und Mg^{++} Ionen, pH 7,0)
PEG	Polyethylenglycol
PLC 1	Phospholipase C Typ 1
p. i.	post infectionem
SPF	spezifisch pathogen frei
SN	Serumneutralisation

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

2. Schrifttum

- 2.1. Geschichte der Hämagglutination (HA)
- 2.2. Wesen der HA
- 2.3. Direkte HA und Hämagglutinationshemmung (HAH) bei der Aviären Infektiösen Bronchitis (AIB)
 - 2.3.1. Indirekte HA und HAH bei der AIB
- 2.4. Herstellung und Lagerung von hämagglutinierendem Antigen des Virus der Aviären Infektiösen Bronchitis (AIBV-HA-Antigen)
 - 2.4.1. HA-Antigen von bebrüteten Hühnereiern
 - 2.4.1.1. Konzentrierung von HA-Antigen in der Allantoisflüssigkeit
 - 2.4.1.2. Vorbehandlung des HA-Antigens
 - 2.4.2. Lagerung des HA-Antigens
- 2.5. Erythrozyten - Gewinnung, Behandlung, Konzentration
- 2.6. Herstellung und Lagerung von Antiserum
 - 2.6.1. Entfernung der unspezifischen Agglutinine
 - 2.6.2. Entfernung der unspezifischen HA-Inhibitoren
 - 2.6.3. Lagerung des Antiserums
- 2.7. Systeme zur Durchführung der HA und HAH
 - 2.7.1. HA in Mikroplatten (U- oder V-Platten)
 - 2.7.2. HAH in Mikroplatten (U- oder V-Platten)
- 2.8. HA - und HAH - Titer
 - 2.8.1. HA - Titer
 - 2.8.2. HAH - Titer
- 2.9. Serumneutralisation (SN)
 - 2.9.1. Geschichte der SN
 - 2.9.2. Wissenschaftliche Grundlagen
 - 2.9.3. Methodik der SN
 - 2.9.4. Indikatorsysteme

3. u. 4. Material und Methoden
 - 3.1. AIBV-Stämme
 - 3.2. Embryonierete Eier
 - 3.2.1. Küken
 - 3.3. Erythrozyten
 - 3.4. Enzym - Herkunft und Zubereitung
 - 3.5. Herstellung von AIBV-HA-Antigenen
 - 3.5.1. Konzentration durch Ultrazentrifugation
 - 3.5.2. Herstellung nach vorheriger Polyäthylenglycol (PEG) Behandlung
 - 3.5.3. Dialyse mit Polyäthylenglycol (PEG) 20000
 - 3.6. Lagerung von AIBV-HA-Antigenen
 - 3.7. Herstellung und Lagerung der Antiseren
 - 3.8. AIBV-Feldseren
 - 3.9. HA
 - 3.9.1. Durchführung
 - 3.9.2. Ablesung
 - 4.0. HAH
 - 4.0.1. Durchführung
 - 4.0.2. Ablesung
 - 4.1. Serotypendifferenzierung durch Kreuzhämagglutinations-test
 - 4.2. Virusvermehrung und -titration für die SN
 - 4.3. Herstellung von Trachealkulturen
 - 4.4. SN
 - 4.4.1. Durchführung
 - 4.4.2. Ablesung
 - 4.5. Serotypendifferenzierung durch Kreuzneutralisations-test
 - 4.6. Statistik
5. Ergebnisse
 - 5.1. HA-Titer bei verschiedenen Methoden der Virus-konzentrierung und Titerveränderungen
 - 5.1.1. Titerveränderungen der verschiedenen AIBV-HA-Antigene bei Kühlschranktemperatur (4°C)

- 5.2. Vergleich der HAH-Titer mit SN-Titer bei Feldseren
 - 5.2.1. HAH-Titer gegen das M₄₁-Virus im Vergleich zum SN-Titer gegen das H₅₂-Virus
 - 5.2.1.1. Vergleich der Massachusetts-Viren H₅₂ und M₄₁ bei der SN
 - 5.2.2. HAH-Titer gegen die D-274 Variante im Vergleich zum SN-Titer gegen die Varianten D-207, D-3128 und D-3896
 - 5.2.3. HAH-Titer gegen die D-1466 Variante im Vergleich zum SN-Titer gegen die D-212 Variante
- 5.3. Kreuzhämagglutinationstest der AIBV-Stämme H₅₂, M₄₁, D-274 und D-1466



- 6. Diskussion
- 7. Zusammenfassung
- 8. Literaturverzeichnis

1. Einleitung

Zum Nachweis antigener Unterschiede beim Virus der Aviären Infektiösen Bronchitis (AIBV) sind bisher schon verschiedene in der Serologie übliche Methoden versucht worden, der Einsatz der Hämagglutinationshemmung (HAH) gehörte jedoch nicht dazu, denn das AIBV galt nicht als hämagglutinierend.

Ab 1975 erschienen jedoch eine Reihe von Arbeiten, die zeigten, daß viele AIBV-Stämme auch ein Hämagglutinin besitzen, das aber erst nach Zerstörung der Virushülle mit Phospholipase nachgewiesen werden kann (Bingham et al, 1975; Alexander et al, 1976; Alexander und Chettle, 1977; Lashgari und Newman, 1982).

Es konnte auch gezeigt werden, daß sich mit Hilfe der HAH gewisse antigene Unterschiede aufzeigen lassen (Alexander et al, 1976; Lashgari und Newman, 1984, King und Hopkins, 1984; Brown und Bracewell, 1985).

In der hier vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob sich die Erfahrungen der englischen und amerikanischen Arbeitsgruppen auch mit für uns wichtigen Serotypen bestätigen lassen und inwieweit sie für Felduntersuchungen geeignet sind.

2. Schrifttum

2.1. Geschichte der Hämagglutination (HA)

Nach Mayr et al (1977) haben einige Virusarten die Eigenschaft, Erythrozyten bestimmter Spezies zu agglutinieren, was im Jahre 1941 von Hirst sowie Mc. Clelland und Hare erstmals beim Influenzavirus mit Hühnererythrozyten beobachtet wurde. Die hämagglutinierende Wirkung des Influenzavirus ließ sich titrieren und für die quantitative Bestimmung von Antigenaktivitäten in Virussuspensionen heranziehen. Darüber hinaus war es möglich, die HA mit spezifischen Antikörpern zu hemmen und für den quantitativen Nachweis spezifischer Antikörper zu verwenden. Diese Reaktion wird als HAH bezeichnet und stellt eine der am einfachsten durchführbaren serologischen Reaktionen dar.

Seit dem erstmaligen Nachweis von Hämagglutininen bei Influenzaviren sind hämagglutinierende Eigenschaften bei Virusarten zahlreicher anderer Gruppen nachgewiesen worden, so daß sich die HAH für den Antikörpernachweis einer großen Anzahl verschiedener Virusinfektionen sowie für die Typisierung von hämagglutinierenden Virusstämmen eignet.

2.2. Wesen der HA

Nach Mayr et al (1977) enthalten viele Virusarten auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, die die Fähigkeit besitzen, sich an Rezeptoren auf der Erythrozytenmembran zu binden und diese Erythrozyten zu agglutinieren. Diese hämagglutinierenden Komponenten werden als Hämagglutinine bezeichnet. Die Hämagglutinine sind an bestimmte Strukturkomponenten des Virions gebunden.

Bei Virusarten mit Hülle sind die hämagglutinierenden Aktivitäten in der Hülle lokalisiert, hierzu gehört auch

das AIBV, ein Coronavirus.

Bei nackten Virusarten ist die hämagglutinierende Aktivität Teil des Kapsids oder sie ist wie bei Adenoviren in der Fibrilkomponente eingebaut.

Hämagglutinierende Struktureinheiten können losgelöst vom intakten Virion in Geweben vorkommen, in denen eine Virusvermehrung stattgefunden hat. Sie werden als lösliche Hämagglutinine bezeichnet. Lösliche Hämagglutinine können auch während der Replikation gebildet werden. Dabei handelt es sich um eine Überschußproduktion von Hämagglutininen, die nicht in Virionen eingebaut werden, oder es können defekte Virionen bzw. Virusabbauprodukte sein.

Neben virusspezifischen sind in Chorionallantoismembranen auch unspezifische Hämagglutininaktivitäten nachgewiesen worden, die eine spezifische Hämagglutination vortäuschen können.

Die Hämagglutination stellt somit eine Methode dar, mit der sich entweder intakte Virionen oder hämagglutinierende Untereinheiten von Viruspartikeln nachweisen lassen. Der Titer steht in direkter Abhängigkeit zur Konzentration von Virionen und ihrem Aggregationszustand in einer Virus-suspension.

Hämagglutinationstiter werden durch die Reaktionsbedingungen, die von Virusart zu Virusart verschieden sind, beeinflußt.

Als Faktoren sind die Konzentration und das Spektrum der für die Hämagglutination verwendeten Erythrozyten, der pH-Wert, die Reaktionstemperatur und bei einigen Virusarten das Vorhandensein divalenter Kationen oder anderer Zusätze bekannt.

Schwierigkeiten können im Vorkommen nicht viraler, unspezifischer Agglutinine in Seren und Gewebeextrakten oder unspezifischer Inhibitoren in Seren und infizierten Geweben oder Antigensuspensionen entstehen. Hier sind zeitraubende Vorbehandlungen notwendig, die den Wert der Methode etwas einschränken. Für die meisten der bekannten hämagglutinierenden Virusarten liegen jedoch Erfahrungswerte über die verschiedenen Reaktionsbedingungen vor.

2.3. Direkte HA und HAH bei der Aviären Infektösen Bronchitis (AIB)

Das AIBV bewirkt nicht ohne weiteres eine Erythrozytenagglutination, sondern es ist dazu eine Vorbehandlung mit Trypsin (Corbo und Cunningham, 1959), Äther (Biswal et al, 1966) oder mit Phospholipase C Typ I (PLC 1) (Bingham et al, 1975) unter Einhaltung der Standardmethoden (Alexander und Chettle, 1977) notwendig, um die verdeckten Hämagglutinine freizulegen. Jedoch nicht alle AIBV-Stämme entwickeln auf diese Weise hämagglutinierende Eigenschaften (Alexander et al, 1976).

Die HAH ist eine Virusneutralisationsreaktion, bei der die Wirkung der Hämagglutinine durch Antikörper aufgehoben wird. Die HAH wird in der Praxis zur Überprüfung der Immunantwort nach Impfungen durchgeführt (Mac Pherson und Feest, 1978; Bracewell, 1982; Marius et al, 1982, King und Hopkins, 1983; Lütticken und Cornelissen, 1984, Monreal et al, 1985; Holmes und Finney, 1985), ebenso zum serologischen Vergleich, zur Überprüfung antigener Verwandtschaft und zur Typendifferenzierung (Lashgari und Newman, 1984; King und Hopkins, 1984; Brown und Bracewell, 1985).

2.3.1. Indirekte HA und HAH bei der AIB

Nach Mayr et al (1977) ist die indirekte HA eine Präzipitation, bei der Erythrozyten nur als Reaktionsindikator dienen. Das zu präzipitierende Antigen wird mittels bestimmter chemischer Substanzen an die Erythrozytenoberfläche gekoppelt (sensibilisierte Erythrozyten). Gibt man zu den sensibilisierten Erythrozyten antigenhomologe Antikörper, so kommt es zwischen dem gekoppelten Antigen und den korrespondierenden Antikörpern zu einer Bindung und es entstehen Antikörperbrücken zwischen den antigenummantelten Erythrozyten, die sich zu Ketten, Netzen und schließlich sedimentierenden Konglomeraten ausweiten. Es tritt also das Bild der Hämagglutination auf, weshalb diese Reaktion als indirekte Hämagglutination bezeichnet wird.

Bestimmte Antigene werden spontan von Erythrozyten absorbiert, bei der Mehrzahl der Proteine ist dies jedoch nicht der Fall und es muß zuerst die Erythrozytenoberfläche vorbehandelt werden. Für die indirekte HA mit Virusantigen ist in früheren Jahren ausschließlich Tannin als Koppelungsmittel verwendet worden. Erfolgreiche Tests sind mit dem AIBV beschrieben worden (Brown et al, 1962; Vasington et al, 1963; Mohanty et al, 1964).

Die indirekte HAH gliedert sich in 2 Abschnitte. Im ersten wird Antiserum mit Antigen gemischt. Korrespondieren beide Komponenten, so entstehen Antigen - Antikörperkomplexe, die nicht mehr reaktionsfähig sind. Korrespondieren Antigen und Antikörper nicht, so tritt keine Bindung ein und die Antikörper bleiben reaktionsfähig.

Im zweiten Abschnitt werden dem Antigen - Antiserum - Gemisch als Indikatorsystem Erythrozyten zugesetzt, an die Antigen, das mit den Antikörpern des Antiserums korrespondiert, gekoppelt ist.

Kam im ersten Abschnitt eine Bindung zwischen Antigen und Antikörper zustande, so sind keine Antikörper mehr frei, die im zweiten Abschnitt mit den sensibilisierten Erythrozyten reagieren können; es tritt somit keine indirekte HA auf. Ist im ersten Abschnitt keine Bindung eingetreten, so können im zweiten Abschnitt die freien Antikörper mit den sensibilisierten Erythrozyten reagieren, und es kommt zur indirekten HA.

Daß die indirekte HA und HAH bzw. ihre Modifikationen nur wenig Anwendung in der Virusserologie gefunden haben, liegt einerseits an der etwas umständlichen Technik, andererseits stehen bei den meisten Virusarten andere, einfachere serologische Reaktionen zur Verfügung.

2.4. Herstellung und Lagerung von Antigenen

Nach Mayr et al (1977) werden Antigene für die HAH entweder im Versuchstier, im bebrüteten Hühnerei oder in Zellkulturen produziert. In vielen Fällen ist eine Behandlung des Antigens nicht notwendig, in einigen Fällen läßt sich der HA-Titer durch bestimmte Behandlungsprozesse wesentlich erhöhen. Zu diesen Techniken gehören Extraktion von Antigenen aus virus-haltigen Organen, Behandlung zur Entfernung von Inhibitor-aktivitäten, Aufschluß von Zellen zur Freisetzung von HA-Antigenen, Spaltung von intakten Virionen zur Erhöhung der HA-Aktivität oder Konzentration von Antigenen zur Anreicherung der Hämagglutinine.

2.4.1. HA-Antigene von bebrüteten Hühnereiern

Für die Herstellung von HA-Antigenen werden 8 - 11 Tage alte embryonierte Hühnereier aus spezifisch pathogen freien (SPF) Beständen verwendet, die über die Allantoishöhle mit 0,1 ml Virus mit einer mittleren Embryo infektiöse Dosis (EID₅₀)

von 10^6 - 10^8 infiziert und bei 37° C bebrütet werden. Unterschiede ergeben sich lediglich bei der Bebrütungsdauer. So ernten Corbo und Cunningham (1959), Bingham et al (1975) und Biswal et al (1966) nach 72 Std., Alexander und Chettle (1977) nach 72 - 96 Std., Lashgari und Newman (1982) nach 30 Std. und Gerlach (pers. Mitt. 1986) nach 48 Std.

Vor der Ernte der Allantoisflüssigkeit werden tote Embryonen verworfen, noch lebende Embryonen mindestens 3 Std. (Alexander und Chettle, 1975) oder über Nacht bei 4° C (Lashgari und Newman, 1982) abgetötet. Die geerntete Allantoisflüssigkeit kann bei -30° C (Corbo und Cunningham, 1959), bei -62° C (Biswal et al, 1966) oder bei 4° C (Alexander und Chettle, 1977) gelagert werden.

2.4.1.1. Konzentrierung von HA-Antigenen in der Allantoisflüssigkeit

Zuerst wird die Allantoisflüssigkeit bei 1.400 g über 10 Min. (Biswal et al, 1966), bei niedriger Geschwindigkeit (Alexander und Chettle, 1977), bei 1.000 g über 45 Min. (King und Hopkins, 1983; King, 1984), bei 2.000 g über 20 Min. (Monreal et al, 1985), bei 2.600 g über 30 Min. (Shunsuke et al, 1985) geklärt.

Andere Autoren zentrifugieren die aufgetaute Allantoisflüssigkeit bei 4° C und 3.000 U/Min. über 20 Min. (Corbo und Cunningham, 1959; Bingham et al, 1975) ohne vorher zu klären.

Alexander et al (1976) konzentrieren das Virus in der Allantoisflüssigkeit auf das 100-fache der Ausgangsmenge indem sie bei 30.000 g über 40 Min. zentrifugieren. Alexander und Chettle (1977) verwenden das gleiche Verfahren.

Lashgari und Newman (1982) zentrifugieren über 180 Min. bei 30.000 g, King und Hopkins (1983) über 40 Min. bei 39.000 g, Monreal et al (1985) über 180 Min. bei 33.000 g, Shunsuke et al (1985) über 90 Min. bei 39.000 g und Gerlach (pers. Mitt. 1986) über 120 Min. bei 38.000 g.

2.4.1.2. Vorbehandlung des HA-Antigens

Corbo und Cunningham (1959) erreichten über eine Vorbehandlung des AIBV mit Trypsin eine Erythrozytenagglutination. Zur Erhöhung des HA-Titers sowie zur besseren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der HAH können die Antigene vor dem Zentrifugieren einer Äther- oder Tween-Äther-Behandlung unterzogen werden (Mayr et al, 1977).

Die Polyethylenglykol (PEG) - Fällungs - Methode von Beard et al (1975) beschrieben, mit anschließender Zentrifugation über 90 Min. bei 3.900 g, ist eine Alternative zur Ultrazentrifugation bei 39.000 g (King, 1984).

Nach der Konzentrierung des Virus durch Zentrifugieren wird der Überstand verworfen und das Sediment in 0,01 M Tris/HCl Puffer mit einem pH-Wert von 6,4 (Alexander et al, 1976; Alexander und Chettle, 1977) oder in Tris-HCl Puffer mit pH 7,2 (Lütticken und Cornelissen, 1984) oder in HEPES - gepuffertem Salz (5,96 g HEPES, 8,19 g NaCl und 0,15 g CaCl_2 pro Liter destilliertem und demineralisiertem Wasser mit einem pH von 6,5 mit 1 N NaOH eingestellt), (King und Hopkins, 1983; King, 1984) aufgenommen. Einige Autoren geben dem Tris - HCl - Puffer gleich die Phospholipase zu: 3 Einheiten Phospholipase C Typ 1 (PLC 1) pro ml (Lashgari und Newman, 1982; Monreal et al, 1985; Gerlach, pers. Mitt. 1986) 7,5 Einheiten PLC 1 pro ml (Shunsuke et al, 1985). Alexander et al (1976) sowie Lütticken und Cornelissen (1984) nehmen 1 Einheit PLC 1 pro ml Dulbecco Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) (ohne Ca^{++} und Mg^{++} -Ionen, pH 7,0) und geben sie zu gleichen Teilen dem in Tris -

HCl-Puffer aufgenommenen Virus-Sediment zu.

Alexander und Chettle (1977) nehmen 5 Einheiten pro ml. King und Hopkins (1983) sowie King (1984) geben dem Virus-konzentrat zu gleichen Teilen PLC 1 (1 Einheit pro ml) zu.

Bevor die Mischung inkubiert wird, kann sie vorsichtig mehrmals durch eine dünne Nadel gespritzt werden, um eventuelle Verklumpungen von Virus aufzubrechen, was zu einem höheren HA-Titer führt (Lashgari und Newman, 1982). Über die Dauer der Inkubation liegen unterschiedliche Angaben vor: Alexander et al (1976) inkubieren die Mischung 30 Min. bei 37° C, Alexander und Chettle (1977); Lashgari und Newman (1982); King und Hopkins (1983/1984); Lütticken und Cornelissen (1984); King (1984); Monreal et al (1985); Gerlach (pers. Mitt. 1986) 2 Std. bei 37° C, Shunsuke et al (1985) 1 Std. bei 37° C.

2.4.2. Lagerung des HA-Antigens

Nach Mayr et al (1977) werden über die Lagerung von HA-Antigen folgende Angaben gemacht: Das Ziel der Konservierung von Virusmaterial ist die Erhaltung der Aktivität über längere Zeit. Dazu sind einige Milieufaktoren zu beachten. Die wichtigsten Faktoren sind die Temperatur und die Zusammensetzung des Mediums. Virusmaterial wird immer bei tiefen Temperaturen gelagert; dabei werden zusätzlich isotonisch-gepufferte Verdünnungslösungen verwendet. Die Gefäße sind zu verschließen.

Ausgezeichnete, lang anhaltende Konservierung von Virusmaterial kann auch mit der Gefriertrocknung vorgenommen werden.

Über die Lagerung von AIBV-HA-Antigen liegen unterschiedliche Angaben vor. Lyophilisiert war das Antigen bei 37° C über 4 Wochen haltbar (Watt und Macpherson, 1980). Lashgari und Newman (1982) lagern das Antigen flüssig oder lyophilisiert bei 4° C; ebenso Lütticken und Cornelissen (1984), jedoch nur lyophilisiert und auch bei -20° C.

Getrocknetes und unter Vakuum verschlossenes hämagglutiniertes AIBV-Antigen war bei -70°C , -20°C und $+4^{\circ}\text{C}$ 3 Monate haltbar (Biswal et al, 1966).

Lagerung bei -20°C über Nacht oder bei -60°C über mehrere Wochen zeigten keinen Titerabfall, auch wenn das Antigen auf 4 bis 8 HA-Einheiten verdünnt war (Alexander et al, 1976).

Das Antigen sollte nach PLC-Behandlung bei 4°C (Alexander und Chettle, 1977; King und Hopkins, 1983/1984; King, 1984; Gerlach, pers. Mitt. 1986) oder bei -80°C (Poli et al, 1982) gelagert werden.

2.5. Erythrozyten- Gewinnung, Behandlung, Konzentration

Für die HA und HAH werden meist Erythrozyten von Mammaliern oder vom Haushuhn benutzt. Hühnererythrozyten sind beim AIBV am besten geeignet. Das Blut wird in Natriumcitrat (3,8%) oder Alsever's Lösung aufgenommen. Danach erfolgt ein 2 - 3 maliges Waschen (5 Min. bei 2.000 U/Min.) in 0,85%igem NaCl. Die Zentrifugation im letzten Waschgang wird in einem graduerten Röhrchen vorgenommen. Die Erythrozytenkonzentration wird je nach System zwischen 0,25 und 1 Vol % mit einem geeigneten Puffer (PBS) hergestellt. Bei Eintritt einer Hämolyse sind die Zellsuspensionen zu verwerfen (Mayr et al. 1977).

Corbo und Cunningham (1959), Biswal et al (1966), Bingham et al (1975) sowie King und Hopkins (1983) benutzten bei der AIB-HA bzw. HAH eine 0,5%ige Hühnererythrozytenaufschwemmung; Monreal et al (1985) eine 0,75%ige und Alexander und Chettle (1977) sowie Gerlach (pers. Mitt. 1986) eine 1%ige Aufschwemmung von Erythrozyten. Im allgemeinen werden sie mehrmals in Verdünnungslösung (PBS) gewaschen und in der gleichen Flüssigkeit aufgeschwemmt.

2.6. Herstellung und Lagerung von Antiserum

Zur Herstellung von Antiserum verwendet man vorzugsweise SPF-Küken (Lashgari und Newman, 1984; Brown und Bracewell, 1985). Von anderen Untersuchern werden auch kommerzielle, jedoch nicht geimpfte Küken im Alter von 3 Wochen (Alexander et al, 1976; King und Hopkins, 1984), 3 - 6 Wochen (King und Hopkins, 1983) oder 53 Tagen (Shunsuke et al, 1985) bezogen. Über die Art der Applikation liegen sehr unterschiedliche Angaben vor. Shunsuke et al (1985) injiziert i. m. im Alter von 53 Tagen wöchentlich 5 mal mit Viruspartikeln das mit Freund'schen Adjuvans gemischt war, Brown und Bracewell (1985) im Alter von 6 Wochen intranasal mit 0,2 ml Virus pro Tier, King und Hopkins (1984) im Alter von 3 Wochen intratracheal, Lashgari und Newman (1984) im Alter von 4 Wochen intranasal mit 0,2 ml Virus, 10^7 EID₅₀ pro Tier, King und Hopkins (1983) im Alter von 3 - 6 Wochen durch Tropfen in die Augen und intratracheal oder Alexander et al (1976) im Alter von 3 Wochen über Aerosole.

Cavanagh et al (1984) zeigen, daß die Antigene weniger in den Proteinen der Membran oder des Nukleocapsids zu finden sind, sondern hauptsächlich in den Proteinen der Peplomeren.

Die Blutentnahme und anschließende Serumgewinnung erfolgt vom 3. - 42. Tag nach der Infektion (Alexander et al, 1976), nach 3 - 4 Wochen p. i. (King und Hopkins, 1983), wöchentlich bis zur 4. Woche p. i. (Lashgari und Newman, 1984), nach 4 Wochen p. i. (King und Hopkins, 1984), nach 3 Wochen p. i. (Brown und Bracewell, 1985) oder 1 Woche nach der letzten Inokulation (Shunsuke et al, 1985).

2.6.1. Entfernung unspezifischer Agglutinine

In Seren, die für die HAH-Reaktion verwendet werden, können unspezifische Agglutinine (Isoagglutinine) für heterologe,

manchmal auch homologe Spezies vorkommen. Sie interferieren mit der spezifischen Agglutinations- und HAH-Reaktion und sind daher unerwünscht.

Um sie zu entfernen, werden die Seren mit Erythrozyten der Spezies absorbiert, die später im HAH-Test verwendet werden. Zu 0,5 ml Serumverdünnung werden 0,05 ml einer 50%igen Erythrozytensuspension gegeben, die Mischung wird geschüttelt und bei 4° C 1 - 2 Stunden belassen. Die Adsorption findet bei 4° C unter optimalen Bedingungen statt, da unspezifische Agglutinine bei dieser Temperatur besonders aktiv sind. Dann erfolgt die Abzentrifugation der Erythrozyten für 10 Min. bei 600 - 800 g (Mayr et al, 1977).

2.6.2. Entfernung unspezifischer HA-Inhibitoren

So, wie unspezifische Agglutinine, können in den Seren auch unspezifische HA-Inhibitoren vorkommen, die vor Verwendung der Seren im HAH-Test ebenfalls entfernt werden müssen. Unspezifische HA-Inhibitoren können thermolabil sein. Die Eliminierung erfolgt nach verschiedenen Verfahren. Die Methoden zur Inhibitorbehandlung sollten so beschaffen sein, daß die Antikörperkonzentration nicht beeinflußt wird und mit verschiedenen Serumproben in verschiedenen Tests reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Hitzeinaktivierung sowie Kaolinbehandlung sind zwei der am häufigsten angewandten Verfahren. Bei der Hitzeinaktivierung wird 30 Min. bei 56° C oder 62° C inkubiert. Der Erfolg ist minimal.

Bei der Kaolinbehandlung werden β -Lipoprotein-Inhibitoren sehr effektiv adsorbiert, jedoch wird durch die Behandlung auch der Antikörpergehalt etwas reduziert. Kaolin reagiert darüber hinaus unterschiedlich mit Antikörpern verschiedener Herkunft. Die Ursachen der Heterogenität von Antikörpern in der Reaktivität mit Kaolin sind unbekannt (Mayr et al, 1977). Störende Lipide können nach der von Woernle (1966) beschriebenen Methode mit Chloroform entfernt werden. Bei der AIB wird

von Shunsuke et al (1985) die Kaolinbehandlung bevorzugt. Lashgari und Newman (1984); Hatcher et al (1983) sowie Alexander et al (1976) führen eine Hitzebehandlung bei 56° C über 30 Min. durch.

2.6.3. Lagerung des Antiserums

Auch für die Lagerung des Serums bis zum Test werden unterschiedliche Lagertemperaturen empfohlen. Hatcher et al (1983) lagern es bei -10° C, Lashgari und Newman (1984) und Brown und Bracewell (1985) bei -20° C oder Shunsuke et al (1985) bei -80° C.

2.7. Systeme zur Durchführung der HA und HAH

Für die HA und HAH wurden früher Glasröhrchen verwendet, heute haben sich allgemein Mikrotiterplatten durchgesetzt.

2.7.1. HA in Mikroplatten (U- oder V-Platten)

Antigene werden in 2-er Potenzen in V-Platten verdünnt. 0,025 ml Verdünnungslösung (PBS) werden in jede Reaktionsvertiefung der ersten Reihe der Mikroplatte getropft. In die erste Reaktionsvertiefung der Reihe kommen nun 0,025 ml des Antigens. Dann wird die Verdünnungsreihe mit Mikrodilutern angelegt. Den Verdünnungen wird jeweils 0,025 ml einer 0,5%igen (1%igen, bei Alexander und Chettle, 1977) Erythrozytensuspension zugesetzt. Das Ergebnis wird nach 45 - 60 Min. bei 4° C abgelesen. Der HA-Titer liegt dort, wo noch 75% der Erythrozyten bei höchster Verdünnung hämagglutiniert sind (Bingham et al, 1975; Alexander und Chettle, 1977).

Es können auch U-Platten verwendet werden. Das Ergebnis wird nach 30 - 45 Min. (40 Min. bei King und Hopkins) bei Raumtemperatur abgelesen. Als HA-Titer wird die höchste Antigenverdünnung definiert, bei der noch 100% der Erythrozyten hämagglutiniert werden (Lashgari und Newman, 1982; King und Hopkins, 1984).

2.7.2. HAH-Reaktionen in Mikroplatten (U- oder V-Platten)

Für die HAH werden die Antigene im allgemeinen auf 4 hämagglutinierende Einheiten (Gebrauchsverdünnung) eingestellt (Mayr et al, 1977). Lashgari und Newman (1984) verwenden 8; Monreal et al (1985) 2 hämagglutinierende Einheiten.

Mit 0,025 ml Antiserum werden in 0,025 ml Verdünnungslösung (PBS) eine Verdünnungsreihe erstellt und die gleiche Menge (0,025 ml) Antigen in jede Reaktionsvertiefung zugegeben. Gleichzeitig wird eine Erythrozyten-Antigen-Serumkontrolle durchgeführt.

Über die Dauer der Inkubation der Antiserum-Antigen-Mischung liegen unterschiedliche Angaben vor. Bingham et al (1975) inkubieren 1 Std. bei 4° C, Alexander und Chettle (1977) 15 Min. bei 4° C, Lashgari und Newman (1984) 1 Std. bei 37° C, King und Hopkins (1984) 30 Min. bei 4° C und Monreal et al (1985) 20 Min. bei Raumtemperatur. Danach werden die Erythrozyten zugegeben und das Ergebnis wird nach 45 - 60 Min. bei 4° C (Alexander und Chettle, 1977), nach 30 Min. (Lashgari und Newman, 1984), nach 40 Min. bei Raumtemperatur (King und Hopkins, 1984) oder nach 35 Min. bei Raumtemperatur (Monreal et al, 1985) abgelesen.

Als Serumtiter wird diejenige höchste Serumverdünnung definiert, die noch eine HA hemmen kann. Dabei werden Vergleiche mit den Serum- und Erythrozytenkontrollen gezogen. Die Erythrozyten- bzw. Serumkontrollen dürfen keine HA zeigen, das Gebrauchsantigen muß die festgesetzte hämagglutinierte Einheit aufweisen.

2.8. HA- und HAH-Titer

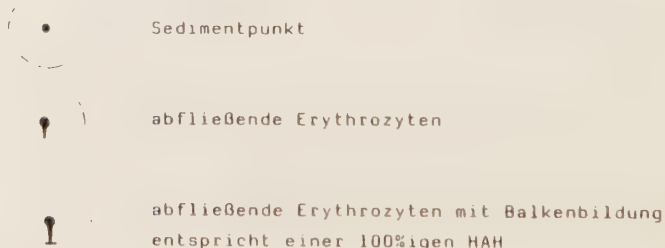
2.8.1. HA-Titer

Der HA-Titer hängt von verschiedenen Parametern ab. Die Sorte der Eier, das Alter der Embryonen, die Anzahl der Passagen

des verwendeten AIBV-Stammes, die Inkubationszeit der Eier nach Beimpfung, die Zeit und Geschwindigkeit der Zentrifugation, die Konzentration des Enzyms, die Inkubationszeit des Virus-Enzym-Gemisches, die Lagerung des Antigens sowie die Herkunft der Erythrozyten haben Einfluß auf den HA-Titer (Lashgari und Newman, 1982).

Auch dem Ablesen des Testes kommt wesentliche Bedeutung zu. Manche Autoren setzen den Endpunkt bei 100%iger Agglutination (Shunsuke et al, 1985; King und Hopkins, 1983; Lashgari und Newman, 1982), andere bei 75%iger Agglutination (Alexander und Chettle, 1977).

Hält man die Mikrotiterplatte in einem Winkel von 45 - 90 Grad, so kann auch das "Laufen" der Erythrozyten als Endpunkt genommen werden (Chulan und Ibrahim, 1982; C. Bell, 1985, pers. Mitteilung). Unter "Laufen" versteht man das Abfließen der Erythrozyten vom Sedimentpunkt bei Neigung der Mikrotiterplatte. Erst wenn die abfließenden Erythrozyten auf dem unteren Rand der Reaktionsvertiefung eine Balkenbildung aufweisen, kann von einer 100%igen HAH gesprochen werden.



Tab. I: Höchste HA-Titer verschiedener Autoren

(Titerangabe in $\log_2$)

	M ₄₁	H ₅₂	Connect.	Arkansas	D-274	D-1466	H-120
D.King, 1984	11	8	10	10			
Lütticken und Cornellissen, 1984	10				10	8	
Alexander und Chettle, 1977	8,1						
Alexander et al, 1976	10	< 1	8				8
Bingham et al, 1975	5		8,5				
C. Bell pers. Mitt. 1985	8						
B. Schemera pers. Mitt. 1985	8				9	7	

2.8.2. HAH-Titer

Die in $\log_2$ angegebenen HAH-Antikörper-Titer liegen beim Massachusetts-Virus M_{41} zwischen 8,2 und 8,8, bei der Hollandvariante D-274 zwischen 8,2 und 10,0, bei der Hollandvariante D-1466 zwischen 5,0 und 11,0 und beim AIBV-Connecticut zwischen 6,7 und 8,2 (Lashgari und Newman, 1984; Lütticken und Cornelissen, 1984; Brown und Bracewell, 1985; Schemera, pers. Mitt. 1985). Dadurch scheint im Kreuzhämagglutinationshemmungstest die Unterscheidung von Serotypen möglich.

2.9. Serumneutralisation (SN)

2.9.1. Geschichte der SN

Der Neutralisationstest wurde bei der AIB erstmals durch van Roeckel (1942, zitiert Darbyshire, 1981) durchgeführt. Er vermischte gleiche Mengen von unverdünntem Serum und unverdünntem Virus in Form von infizierter Allantoisflüssigkeit und inokulierte damit embryonierte Eier, um später die Anzahl überlebender Embryonen festzustellen, welche die Gegenwart spezifischer Antikörper anzeigten.

Beim SN reagiert das komplette, infektionstüchtige Virus mit dem Antikörper. Dulbecco et al (1956) nehmen an, daß jedes Viruspartikel an seiner Oberfläche mehrere Antigenstellen hat und jede Antigenstelle in der Lage ist, sich mit einem neutralisierenden Antikörper zu verbinden. Jede Verbindung zwischen Antikörper und Antigenstelle bedeutet Inaktivierung des Viruspartikels. Das Ergebnis dieser Reaktion wird anschließend in einem biologischen System *in vivo* gemessen, um der Verminderung der viralen Infektiosität einen numerischen Wert geben zu können.

2.9.2. Wissenschaftliche Grundlagen

Mayr et al (1977) fassen die Reaktionsvorgänge folgendermaßen zusammen; sie werden im wesentlichen beeinflusst durch:

1. Das Virus-Antikörperverhältnis im Reaktionsgemisch,
2. die Reaktionsbedingungen,
3. das Indikatorsystem.

Bei der Kinetik des Neutralisationstestes läßt sich eine "Primärphase" und eine "Sekundärphase" unterscheiden. In der Primärphase kommt es nach der Mischung von Virus mit spezifischen, neutralisierenden Antikörpern in Abhängigkeit vom Reaktionsmilieu und vor allem von der Temperatur zu lockeren, überwiegend reversiblen Antigen-Antikörperbindungen bzw. zu Neutralisationsvorgängen an der Oberfläche von Viren. Die Intensität der Reaktion nimmt bis zu einem Temperatur-optimum von 37° C kontinuierlich zu. Bei 37° C sind die ersten Bindungsvorgänge bereits nach 30 Min. abgeschlossen. Die Primärphase geht dann in die Sekundärphase, die sog. Immuno-inaktivierung, über, in der festere Bindungen ausgebildet werden bzw. die Antikörper in das Innere der Virusaggregate vordringen und dort Viruspartikel irreversibel neutralisieren. Für die Feststellung und quantitative Erfassung dieser vielen langsameren Vorgänge wäre eine Vielzahl von Ausverdünnungen der Gemische nach verschiedenen Einwirkungszeiten nötig. Die diagnostische Aussagekraft des Neutralisationstestes würde dadurch aber nicht wesentlich erhöht werden. Man beschränkt sich aus diesem Grunde in der Routinepraxis damit, die während der Primärphase ablaufenden Vorgänge qualitativ und quantitativ zu erfassen.

2.9.3. Methodik der SN

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten: Virusverdünnung und Serumverdünnung.

Die Virusverdünnungsmethode wurde für die AIB von Jungherr und Ferrell (1948) entwickelt und ist bekannt als "Konstantes Serumvariables Virus-Methode" oder κ -Methode. Hierbei wird das Virus stufenweise verdünnt, das Serum bleibt konstant und es wird

der Neutralisationsindex (NI) eines Serums ermittelt, d. h. die durch ein Serum neutralisierbare Virusmenge.

Die Serumsverdünnungsmethode, auch "Konstantes Virus-variables Serum-Methode" oder β -Methode genannt, ist statistisch genauer, aber auch materialaufwendiger und eignet sich besonders zur Untersuchung antigener Unterschiede zwischen AIBV-Stämmen (von Bülow, 1967 b; Dawson und Gough, 1971). Hierbei wird das Serum stufenweise verdünnt und mit einer stets konstanten Virusmenge vermischt.

2.9.4. Indikatorsysteme

Die Wirkung von Virus wird *in vivo* in verschiedenen Indikatorsystemen geprüft, so z. B. in embryonierten Hühnereiern, Versuchstieren, Zellkulturen, Trachealkulturen. Letztere scheinen sich als Indikatorsysteme in besonderer Weise zu eignen, denn sowohl Feldisolate als auch Laborstämme des AIBV verursachen spezifische Veränderungen in Form eines Aufhörens der Ziliarbewegung (Ziliostase) nach einigen Tagen. Bei embryonierten Eiern als Indikatorsystem hingegen zeigen sich die spezifischen Veränderungen am Embryo (Minderwuchs, Einrollen, Absterben) zumeist erst nach mehreren Blindpassagen (M. S. Hofstad, 1984). Die Wirkung des AIBV in der Trachealkultur ist 24 Std. nach der Infektion mikroskopisch als Abrundung und anschließender Ablösung des Flimmerepithels festzustellen. Ein bis vier Tage später hat jegliche Zilienbewegung aufgehört, während die Zilienbewegung in entsprechenden Kontrollkulturen bis zu 40 Tagen erhalten bleiben kann (Colwell und Lukert, 1969). Bei einer *in vivo*-Infektion kommt es ebenfalls, wenngleich sehr viel langsamer, zum Stillstand der Ziliartätigkeit. Die Zellen lösen sich jedoch nicht ab, sondern regenerieren anschließend (Dutta, 1975). Die Titrationsergebnisse in Trachealkulturen sind gleich oder ähnlich denen im embryonierten Hühnerei (Cherry und Taylor-Robinson, 1970; Cook et al, 1976). Zur Anwendung kommen Tracheen von 20 Tage alten

Kükenembryonen (Cook et al, 1976; Darbyshire et al, 1979) oder von 1 Tag bis mehrere Wochen alten SPF-Küken (Johnson und Marquardt, 1975), da maternale Serumantikörper des Individuums, von dem die Trachealkultur stammt, auf die Reaktion des Flimmer-epithels offensichtlich keinen Einfluß haben.

3. u. 4. Material und Methoden

3.1. AIBV-Stämme

Für die Versuche zur HA-Antigenherstellung wurden folgende AIBV-Stämme verwendet:

AIBV-H ₅₂	Impfvirus, IB VAC; IAD, Pharmazeutisches Werk GmbH, Cuxhaven
M ₄₁	Massachusetts Laborstamm, Passagenzahl unbekannt
D-212	150. Eipassage, von Frau Dr. Weßling, Grub
D-207	57. Eipassage, von Dr. Kouwenhoven, Doorn, NL
D-3128	66. Eipassage, von Dr. Kouwenhoven, Doorn, NL
D-3896	54. Eipassage, von Dr. Kouwenhoven, Doorn, NL
D-274	56. Eipassage, von Prof. Kaleta, Univ. Gießen
D-1466	151. Eipassage, von Prof. Kaleta, Univ. Gießen
Aulendorf 82	Isolat Nr. 82, STUA Aulendorf (Locher, 1983)
Arkansas	Passagenzahl unbekannt, Frau Dr. Cortez, Lima
Connecticut	Passagenzahl unbekannt, Frau Dr. Cortez, Lima
NZ A	} 12. Passage, Massey University, Neuseeland
NZ B	
NZ C	
NZ D	
H-120	Impfvirus, IB VAC; IAD, Pharmazeutisches Werk GmbH, Cuxhaven

3.2. Embryonierte Eier

Die Eier stammen aus einer SPF-Herde des STUA Aulendorf.

3.2.1. Küken

Männliche Eintagsküken aus einer kommerziellen Brüterei, in deren Elterntierherden keine Anzeichen einer akuten AIB vorlagen.

3.3. Erythrozyten

Es werden Hühnererythrozyten verwendet, die nach der Tötung der Küken in Alsever Lösung aufgenommen werden. Die Erythrozyten werden 2 - 3 mal in isotonischer NaCl-Lösung gewaschen und anschließend in PBS als 0,75%ige Erythrozytensuspension aufgenommen und bei 4° C über maximal 3 Tage im Kühlschrank gelagert.

3.4. Enzym, Herkunft und Zubereitung

Zum Freisetzen der HA-Aktivität aus den Peplomeren des AIBV wird lyophilisierte PLC 1¹ von Clostridium perfringens verwendet. Das Enzym wird in Trishydroxymethyl-amino-methan - HCl - Puffer (5 Einheiten/ml) gelöst und entweder sofort verwendet oder bei -20° C eingefroren.

Die PLC hatte allerdings unterschiedliche Qualität, eine Charge war überhaupt nicht verwendbar. Auch die PLC einer anderen Firma ² erwies sich für unsere Zwecke als unbrauchbar.

1) SIGMA, chemical company

P. O. BOX 14508, St. Louis, MO., 63178 U.S.A.

2) Calbiochem, Frankfurt

3.5. Herstellung von AIBV-HA-Antigen

Zehn Tage bebrütete SPF-Hühnereier werden mit $10^{4,0-7,0}$ embryo-infektiösen Dosen (EID₅₀) in die Allantoishöhle infiziert und bei 37° C bebrütet. Da der Titer des Inokulums die Länge der Bebrütungszeit beeinflusst (Schemera, pers. Mitt. 1985), schwankt die Bebrütungsdauer je nach Virusgehalt des Inokulums zwischen 24 und 96 Stunden. Bei einem mittleren Virusgehalt von $10^{4,0} - 10^{5,0}$ EID₅₀ werden die Eier mit Variantvirus D-1466 24 - 30 Std., mit Variantvirus D-274 30 - 42 Std. und mit dem Massachusetts Stamm M₄₁ 36 - 96 Std. lang bebrütet.

Die infizierten Eier werden 24 Std. p. i. geschürt. Alle abgestorbenen Eier werden verworfen. Vor dem Ernten der Allantoisflüssigkeit werden die Embryonen bei -20° C (Tiefkühlschrank) über 30 Min. oder bei 4° C (Kühlschrank) über Nacht durch Unterkühlung getötet. Nachfolgend wird die Allantoisflüssigkeit geerntet; ca. 8 - 14 ml pro Ei. Die geerntete Allantoisflüssigkeit wird niedertourig (500 - 1.000 g über 15 Min.) geklärt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° C gelagert.

Infizierte Allantoisflüssigkeit weist auch bei hohem infektiösem Titer keine für die HAH ausreichende HA-Aktivität auf. Sie muß zuerst durch nachfolgende Konzentrationsmethoden erhöht werden.

3.5.1. Konzentration durch Ultrazentrifugation

Die zuvor geklärte Allantoisflüssigkeit (geklärt über 15 Min. bei 2.500 Umdrehungen, das entspricht ca. 800 g, in einer normalen Zentrifuge) wird in einer Ultrazentrifuge (Beckmann, L5-50B; Rotor Typ SW28) folgenden Behandlungsverfahren unterworfen:

1. 3 Std. bei 82.000 g und 4° C.

2. Zuerst Behandlung mit Tween 80-Äther entsprechend den Angaben von Mayr et al (1977), danach wie unter 1.

3. 1 Std. bei 33.000 g und 4° C.

Der Überstand wird abgegossen und das Sediment in 1/100 der Ausgangsmenge Dulbecco Phosphat Puffer ohne Ca^{++} und Mg^{++} (pH ca. 6,9) aufgenommen.

Die Flüssigkeit wird mit einer Spritze mit aufgesteckter, englumiger Kanüle durch 10-maliges Aufziehen resuspendiert, um eventuellen Verklumpungen von Virus zu begegnen.

Als Alternative wurde anfangs auch eine Ultraschallbehandlung der in einem Eisbecher gekühlten Virusflüssigkeit über 3 Min. bei 45 Watt mit einer Frequenz von 4,5 durchgeführt.

Gerätetyp: Sonifier B-12, cell disrupter (Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut)

Anschließend wird der Virusflüssigkeit die gleiche Menge an PLC (in Tris-HCl-Puffer gelöst) zugegeben und die Mischung über 2 Std. bei 37° C im Wasserbad inkubiert. Die Mischung wurde alle 30 Min. durchgeschüttelt.

3.5.2. Herstellung nach vorheriger Polyethylenglycol (PEG) Behandlung

100 ml der geklärten Allantoisflüssigkeit werden mit 8 g granularem PEG (6.000)⁺ sowie mit 2,2 g NaCl versetzt. Die Mischung wird über Nacht auf dem Magnetrührer durchgerührt. Danach kann auf zwei unterschiedlichen Wegen weiter verfahren werden.

Die Mischung wird über 30 Min. bei ca. 4.500 U/Min. (2.700 g) in einer sehr leistungsfähigen Zentrifuge zentrifugiert. Der andere Weg geht über 30 Min. bei ca. 10.000 U/Min. (13.200 g) in der Ultrazentrifuge. Anschließend wird wieder einmal mit der Spritze, einmal mit Ultraschall den Verklumpungen von

⁺ Serva, Heidelberg

Virus begegnet (siehe 3.5.1. Abs. 2). Danach wird wie unter 3.5.1. Abs. 3 weiter verfahren.

3.5.3. Dialyse mit Polyethylenglycol (PEG) 20.000

Allantoisflüssigkeit wird in einem Dialyseschlauch (VISKING-Dialyseschlauch Type 8/32)⁺ etwa 20 Std. lang gegen PEG 20.000⁺ dialysiert und auf 1/50 des ursprünglichen Volumens eingedickt. Anschließend erfolgt die Phospholipasebehandlung.

3.6. Lagerung von AIBV-HA-Antigen

Nach der PLC-Behandlung wird das Virus bei 4° C im Kühlraum gelagert, wobei je nach Virusstamm ein Titeranstieg oder Titerabfall erfolgt.

3.7. Herstellung und Lagerung der Antiseren

Küken aus der SPF-Herde des STUA Aulendorf wurden in Isolatoren (Metall+Plastik, 7760 Radolfzell) aufgezogen und im Alter von 4 - 5 Wochen durch intratracheale, intraokuläre sowie intranasale Inokulation mit etwa 0,5 ml virushaltiger Allantoisflüssigkeit (Titer ca. 10^{4-5} EID₅₀/ml) infiziert. Nach zwei Wochen wurden 0,5 ml virushaltige Allantoisflüssigkeit i. m. verabreicht und auch je ein Tropfen in beide Augen und Nasenlöcher.

Die Blutentnahme (aus der Vena cutanea ulnaris) erfolgt 3 1/2 Wochen nach der Inokulation. Das gewonnene Serum wird durch 30-minütige Inkubation bei 56° C im Wasserbad inaktiviert und danach bei -20° C bis zur späteren Verwendung aufbewahrt.

3.8. AIBV-Feldseren

Die 74 Feldseren stammen alle vom STUA Aulendorf. Einzelheiten über ihre Herkunft sind der Tabelle II zu entnehmen.

+ Serva, Heidelberg

Tab. II: Herkunft der untersuchten AIBV-Feldseren

Seren (Anzahl)	Herkunft	Art der Tiere	Klinische Anamnese
4	Baden-Württemberg	Legehennen	Atemwegserkrankung
3	" "	Küken vom Legetyp	" "
4	" "	Legehennen	" "
3	" "	Küken vom Legetyp	Routineuntersuchung
3	" "	Legehennen	Fettleber
6	Bayern	Legehennen	Atemwegserkrankung
1	Baden-Württemberg	Legehennen	Routineuntersuchung
3	" "	Küken vom Legetyp	" "
3	" "	Küken vom Masttyp	Routineprobe nach der Schlachtung
3	Bayern	Legehennen	Atemwegserkrankung
9	Baden-Württemberg	Junghennen	Fettleber, Atemwegserkrankung
2	Bayern	Legehennen	Leistungsrückgang
4	Baden-Württemberg	Junghennen	Dermatitis
7	" "	Küken vom Masttyp	Routineprobe nach der Schlachtung
3	" "	Althennen	Routineuntersuchung
1	" "	Legehennen	" "
3	" "	Junghennen	Atemwegserkrankung
3	Bayern	Legehennen	" "
3	" "	Legehennen	" "
4	" "	Legehennen	" "
2	Baden-Württemberg	Legehennen	Kokkizidiose

3.9. HA

3.9.1. Durchführung

Antigene werden in $\log_2$ - Verdünnungsreihen in Mikrotiterplatten mit V-förmigem Boden verdünnt. Dazu werden zuerst 0,025 PBS-Verdünnungslösung in jede Reaktionsvertiefung getropft und später in die 1. Reaktionsvertiefung der Reihe 0,025 ml Antigen hinzugefügt. Dann erfolgt die Verdünnung mit Mikrodilutern.

Nun werden 0,025 ml PBS-Verdünnungslösung, analog zur HA-Antigenmenge bei der HAH in jede Reaktionsvertiefung zugeben. Anschließend werden den Verdünnungen jeweils 0,025 ml einer 0,75%igen Erythrozytensuspension zugesetzt. Die Qualität der Erythrozyten ("Erythrozytenkontrolle") wird in einer Reihe, in der Virusantigen durch PBS ersetzt wurde, gesondert überprüft. Nun wird die Mikrotiterplatte bis zum Ablesen, 45 Min. bei 4° C, im Kühlschrank gehalten.

3.9.2. Ablesung

Das Ablesen des HA-Titers erfolgt durch Neigung der Mikrotiterplatte um einen Winkel von 45 Grad, wodurch die Hämagglutination deutlicher vom laufenden Sedimentpunkt unterschieden werden kann (siehe auch 2.8.1., S. 18). Die letzte Verdünnungsstufe mit vollständiger Hämagglutination stellt den HA-Titer des HA-Antigens dar. Abgelesen wird sofort nach Entnahme der Mikrotiterplatte aus dem Kühlschrank. Der HA-Titer des HA-Antigens wird in $\log_2$ angegeben.

4.0. HAH

4.0.1. Durchführung

Für die HAH werden die Antigene auf 4 hämagglutinierende Einheiten (Gebrauchsverdünnung) eingestellt.

Mit 0,025 ml Antiserum werden in 0,025 ml PBS-Verdünnungslösung in einer V-Mikrotiterplatte mit Mikrodilutern eine $\log_2$ Verdünnungsreihe bis zur 11. Reaktionsvertiefung erstellt. Danach wird die gleiche Menge (0,025 ml) Antigen in die jeweiligen Reaktionsvertiefungen zugegeben. Nun bleibt die Antiserum-Antigen-Mischung 30 Min. bei Zimmertemperatur (ca. 20° C) stehen. Nach diesen 30 Min. werden in jede Reaktionsvertiefung 0,025 ml einer 0,75%igen Erythrozyten-suspension zugegeben und die Mikrotiterplatte über 45 Min. bei 4° C im Kühlschrank belassen.

Es wird wiederum in einer extra Reihe eine Erythrozytenkontrolle durchgeführt. Die 12. Reaktionsvertiefung jeder Reihe der Mikrotiterplatte dient als Antigenkontrolle. Eine Serumkontrolle wird ebenfalls stichprobenartig durchgeführt.

4.0.2. Ablesung

Die Ablesung erfolgt entsprechend der unter 3.9.2. gemachten Angaben. Als Hemmung gelten bei den Proben die Serumverdünnungen, bei denen keine HA mehr auftritt. Dabei werden Vergleiche mit den Serum- und Erythrozytenkontrollen gezogen. Die Erythrozyten- bzw. Serumkontrollen dürfen keine HA zeigen, die Antigenkontrolle muß eine vollständige Agglutination der Erythrozyten aufweisen.

Abgelesen wird sofort nach Entnahme der Mikrotiterplatte aus dem Kühlschrank. Der HAH-Titer der Seren wird in $\log_2$ angegeben. HAH-Titer kleiner als 4 gelten als unspezifisch (Cegla, 1986).

4.1. Serotypendifferenzierung durch Kreuzhamagglutinationstest

Um die Ähnlichkeit oder Verschiedenheit mehrerer AIB-Serotypen aufzuzeigen, werden im Kreuzhämagglutinationstest die 3 für uns wichtigen Antigene Massachusetts M₄₁, D-274 und D-1466 gegen die jeweiligen monospezifischen Antiseren (polyklonale Antikörper) sowie gegen das Antiserum H₅₂ durchgeführt.

4.2. Virusvermehrung und -titration für die Serumneutralisation

Die Virusvermehrung geschieht analog der unter 3.5. gemachten Angaben. Die Bestimmung des Titers erfolgt in Trachealkulturen (siehe unter 4.3.) wobei pro Verdünnung fünf Trachealringe verwendet werden und die 50% Endpunktberechnung von Reed und Muench (1938) erfolgt.

4.3. Herstellung von Trachealkulturen

Entsprechend den Angaben von Locher (1983) werden die Trachealkulturen von männlichen Eintagsküken aus einer Brüterei gewonnen. Diese werden durch Kopfschlag betäubt und durch Dislokation der Halswirbelsäule so getötet, daß die Luftröhren nicht beschädigt werden. Nach Entfernen der Halshaut werden die Luftröhren der ganzen Länge nach bis fast zum Kehlkopf entnommen, vom umgebenden Fett- und Bindegewebe befreit und anschließend mit einem scharfen Skalpell in 1 mm breite Ringe geschnitten, welche bis zur weiteren Verarbeitung in einem Erlenmeyer-Kolben mit Medium (siehe unter 4.4.1.) bei 37° C aufbewahrt werden.

4.4. SN

4.4.1. Durchführung

Für die SN in Trachealkulturen wird die O-Methode (Konstantes Virus- Variables Serum) angewendet. Die Virusflüssigkeit wird

auf $10^{2,5-3,5}$ ziliostatische Dosen (CTD₅₀) eingestellt. Das Serum wird zunächst in einer $\log_2$ - Verdünnungsreihe von 1:16 bis 1:1.024 verdünnt. Als Verdünnungsflüssigkeit für Virus und Serum dient Hank's MEM PH 7,2 unter Zusatz von je 2000 E Penicillin und Streptomycin sowie 200 E Moronal pro ml und 2,5%ige 1M HEPES-Pufferlösung, jedoch ohne Zusatz von Serum. Zur Ausschaltung unspezifischer Inhibitoren, wie von Lukert (1973) beschrieben, wird dem Medium auch noch 1,5% Glucose zugesetzt.

Für den SNT werden Virus und Serum in Zellkulturröhrchen aus Glas oder Plastik⁺ bei Zimmertemperatur miteinander vermischt und 60 - 90 Min. zur Neutralisation stehen gelassen. Nach Übertragen von je 4 Trachealringen pro Röhrchen erfolgt die Inkubation bei 37° C auf einem Rollertubegerät⁺⁺ bei 70 - 80 Umdrehungen/Std.

4.4.2. Ablesung

Die Ablesung erfolgt bei den AIBV-Stämmen M₄₁, H₅₂ und D-207 nach 96 Stunden. bzw. nach 11 Tagen bei AIBV-Stamm D-212. Dazu werden die Trachealringe aus den Zellkulturröhrchen auf Objektträger gelegt, mit etwas Medium überschichtet und unter einem normalen Mikroskop bei 125-facher Vergrößerung auf Ziliostase untersucht. Als ziliostatisch wird eine Kultur dann angesehen, wenn über 90% der Zilien unbeweglich sind. Als Kontrolle dienen nicht infizierte Trachealkulturen sowie Versuchsansätze mit negativem Hühnerserum. Der Serumtiter errechnet sich durch Endpunktbestimmung aus dem $\log_2$ -Wert derjenigen Serumverdünnung, bei der noch alle Luftröhrchen eindeutige Ziliarbewegung zeigen. Sie stellen das arithmetische Mittel der Ergebnisse zweier voneinander unabhängiger Versuchsansätze dar, wobei nur solche Ergebnisse gewertet werden, die nicht mehr als eine Verdünnungsstufe voneinander abweichen.

+ PS-Röhrchen, oberflächenbehandelt, 16 x 100 mm,
Greiner Labortechnik, 7440 Nürtingen

++ Firma Schütt, 3400 Göttingen

4.5. Serotypendifferenzierung durch Kreuzneutralisation

Bei der Kreuzneutralisation hatte sich bereits die große Ähnlichkeit der Hollandvariante D-274 mit dem AIBV-Serotyp D-207 und D-3896, weniger mit D-3128, sowie der Hollandvariante D-1466 mit dem AIBV-Serotyp D-212, gezeigt (Davelaar et al, 1984).

Diese Untersuchungen wurden bei uns durch SN in Trachealkulturen zum Teil wiederholt.

4.6. Statistik

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse schien vor allem die Korrelation der SN und HAH von Interesse. Sie wurde nach folgender Formel berechnet (Hewlett Packard, HP-85, Standard Paket S. 35 - 36):

$$r^2 = \frac{\left[\sum x_i y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n} \right]^2}{\left[\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right] \left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right]}$$

Die Logarithmische Kurvenanpassung wurde ebenfalls nach folgender Formel berechnet (Hewlett Packard, HP-85, Standard Paket S. 35 - 36):

$$r^2 = \frac{\left[\sum y_i \ln x_i - \frac{1}{n} \sum \ln x_i \sum y_i \right]^2}{\left[\sum (\ln x_i)^2 - \frac{1}{n} (\sum \ln x_i)^2 \right] \left[\sum y_i^2 - \frac{1}{n} (\sum y_i)^2 \right]}$$

Es wurde folgender Rechenkomputer verwendet:

Hewlett Packard PC 85 B der Firma Hewlett Packard GmbH
7030 Böblingen, Herrenbergerstr. 110

5. Ergebnisse

5.1. HA-Titer bei verschiedenen Methoden der Virus- konzentrierung und Titerveränderungen

•

Tabelle III zeigt die HA-Titer mit den AIBV-Stämmen M_{41} , D-274 und D-1466 sowie Titerveränderungen nach einer bestimmten Zeit.

In Tabelle IV werden die Titer mit den anderen behandelten AIBV-Stämmen dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, daß sich durch Ultrazentrifugation bei den von uns verwendeten AIBV-Stämmen M_{41} , D-274 und D-1466 die höchsten HA-Titer erreichen lassen. "

Tab. III HA-Titer mit den Virusstämmen M₄₁, D-274 und D-1466 bei verschiedenen Methoden der Viruskonzentrierung und Titerveränderungen während der Lagerung

AIHV-Stamm	Zeit nach Herstellung (Ta., Wo., Mo.)	"Nullwert"	UZ I	UZ II	UZ III	PEG I	PEG II	PEG III	PEG IV
M ₄₁	1 Tag	-	32	32	4	64	8	64	16
	1 Woche	-	64	64	4	64	64	64	32
	4 Wochen	-	256	256	4	n. d.	n. d.	128	64
	8 Wochen	-	256	256	n. d.			n. d.	n. d.
	6 Monate	-	256	n. d.					
D-274	1 Tag	-	128	128					
	1 Woche	-	128	128	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	1 Woche	-	64	64					
	2 Wochen	-	32	32					
D-1466	1 Tag	-	64	64					
	3 Tage	-	32	32	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.
	4 Tage	-	16	32					
	5 Tage	-	8	16					
	1 Woche	-	4	8					

- UZ I: Ultrazentrifugation über 3 Std. bei 82.000 g
- UZ II: Ultrazentrifugation über 1 Std. bei 33.000 g
- UZ III: Ultrazentrifugation über 3 Std. bei 82.000 g nach vorheriger Behandlung des Virus mit Tween 80-Ather
- PEG I: Ultrazentrifugation über 30 Min. bei 13.000 g nach vorheriger Polyethylenglycol (PEG) Behandlung. Danach wird mit einer Spritze mit enghalsiger Kanüle die Virusflüssigkeit durch 10-maliges Aufziehen resuspendiert um eventuellen Verklumpungen von Virus zu begegnen.
- PEG II: Wie PEG I nur anstatt der Spritze wird hier ein Ultraschallgerät verwendet.
- PEG III: Normale Zentrifugation über 30 Min. bei 2.700 g. Danach Weiterbehandlung wie bei PEG I.
- PEG IV: Normale Zentrifugation über 30 Min. bei 2.700 g. Danach Weiterbehandlung wie bei PEG II mit Ultraschallgerät.
- n. d. Nicht durchgeführt

Tab. IV HA-Titer mit 16 serologisch unterschiedlichen AIBV-Stämmen bei verschiedenen Methoden
der Viruskonzentrierung

AIBV-Stamm	"Nullwert"	UZ I	UZ II	UZ III	PEG I	PEG II	PEG III	PEG IV
M-41	-	356	256	4	64	64	128	64
D-274	-	128	128	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
D-1460	-	64	64	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
H-52	-	4	8	-	8	8	8	8
D-07	-	2	2	-	-	-	-	-
D-212	-	-	-	-	-	-	-	-
J-3896	-	-	-	-	-	-	-	-
D-3128	-	-	-	-	-	-	-	-
H-120	-	-	-	-	-	-	-	-
Arkansas	-	4	4	-	16	16	16	16
Connecticut	-	2	8	-	32	32	32	64
Aulendorf 82	-	-	-	-	-	-	-	-
NZ A	-	64	32	-	32	8	32	32
NZ B	-	4	8	-	32	32	32	32
NZ C	-	8	8	-	8	8	8	8
NZ D	-	4	8	-	32	32	32	32

UZ I: Ultrazentrifugation über 3 Std. bei 82.000 g

UZ II: Ultrazentrifugation über 1 Std. bei 33.000 g

UZ III: Ultrazentrifugation über 3 Std. bei 82.000 g nach vorheriger Behandlung des Virus mit Tween-80-Äther

PEG I: Ultrazentrifugation über 30 Min. bei 13.000 g nach vorheriger Polyethylenglycol (PEG) Behandlung. Danach wird mit einer Spritze mit englumiger Kanüle die Virusflüssigkeit durch 10-maliges Aufziehen re-suspendiert um eventuellen Verklumpungen von Virus zu begegnen.

PEG II: Wie PEG I nur anstatt der Spritze wird hier ein Ultraschallgerät verwendet.

PEG III: Normale Zentrifugation über 30 Min. bei 2.700 g. Danach Weiterbehandlung wie bei PEG I.

PEG IV: Normale Zentrifugation über 30 Min. bei 2.700 g. Danach Weiterbehandlung wie bei PEG II mit Ultra-schallgerät.

n. d.: Nicht durchgeführt

5.1.1. Titerveränderungen der verschiedenen AIBV-HA-Antigene bei Kühlschranktemperatur (4° C)

Es sind nur die für uns wichtigen AIBV-HA-Antigene überprüft worden (Tab. III).

Beim Massachusetts-Virus M_{41} läßt sich ein kontinuierlicher Titeranstieg über bis zu 12 Wochen feststellen; das HA-Antigen behält dann seinen Titer über mindestens 6 Monate.

Bei der Hollandvariante D-274 hält sich der Titer etwa 7 - 9 Tage und fällt dann ab.

Bei der Hollandvariante D-1466 fällt der Titer nach 3 - 5 Tagen stark ab.

5.2. Vergleich der HAH-Titer mit SN-Titer bei Feldseren

5.2.1. HAH-Titer gegen das M_{41} -Virus im Vergleich zum SN-Titer gegen das H_{52} -Virus

Tabelle V und VI sowie die sich daraus ergebenden graphischen Darstellungen in Abbildung 1 und 2 zeigen die engen Beziehungen der beiden Testverfahren SN und HAH bei Verwendung von M_{41} - und H_{52} -Virus. Im allgemeinen weichen die Titer um nicht mehr als eine $\log_2$ -Verdünnungsstufe voneinander ab, wie man sowohl bei Verwendung von Einzelseren als auch bei gepoolten Seren sehen kann.

Die in den Abbildungen 1 und 2 erkennbaren Beziehungen lassen sich statistisch (Abb. 3 u. 4) durch den Korrelationskoeffizient von 0,873 bzw. 0,900 bestätigen.

Serum (Nr.)	M-41 1	HAH-Titer 2 $\bar{x}$	H-5- 1	SN-Titer 2 $\bar{x}$	Serum (Nr.)	M-41 1	HAH-Titer 2 $\bar{x}$	H-5- 1	SN-Titer 2 $\bar{x}$
1	10	11	10,5	8	8	8	8	8	8
2	10	11	10,5	8	8	8	8	8	8
3	11	11	11	7	7	7	7	7	7
4	9	11	10	7	7	7	7	7	7
5	6	7	6,5	8	8	8	8	8	8
6	7	8	7,5	6	6	6	6	6	6
7	6	7	6,5	8	8	8	8	8	8
8	11	11	11	10	10	10	10	10	10
9	10	11	10,5	10	10	10	10	10	10
10	11	11	11	10	10	10	10	10	10
11	10	11	10,5	10	10	10	10	10	10
12	5	7	6	5	5	5	5	5	5
13	5	5	5	5	5	5	5	5	5
14	7	7	7	6	6	6	6	6	6
15	6	5	5,5	5	5	5	5	5	5
16	7	7	7	7	7	7	7	7	7
17	8	8	8,5	7	7	7	7	7	7
18	5	7	6	5	5	5	5	5	5
19	8	9	8,5	8	8	8	8	8	8
20	7	6	6,5	5	5	5	5	5	5
21	10	11	10,5	7	8	7,5	7	7	7
22	5	5	5	6	6	6	6	6	6
23	7	5	7,5	7	7	7	7	7	7
24	11	10	10,5	7	7	7	7	7	7
25	3	3	3	4	4	4	4	4	4
26	6	5	5,5	5	5	5	5	5	5
27	5	5	5	5	4	4,5	4	4,5	4,5
28	5	6	5,5	5	4	4,5	4	4,5	4,5
29	4	5	4,5	5	4	4,5	4	4,5	4,5
30	3	5	4	5	4	4,5	4	4,5	4,5
31	10	11	10,5	10	10	10	10	10	10
32	10	11	10,5	8	8	8	8	8	8
33	9	9	9	9	9	9	9	9	9
34	9	8	8,5	8	8	8	8	8	8
35	11	9	10	8	8	8	8	8	8
36	10	8	9	8	8	8	8	8	8
37	10	9	9,5	9	10	10	10	10	10
38	11	10	10,5	10	10	10	10	10	10
39	11	10	10,5	10	10	10	10	10	10
40	11	10	10,5	10	10	10	10	10	10
41	11	10	10,5	10	10	10	10	10	10
42	11	10	10,5	10	10	10	10	10	10
43	7	8	8,5	8	8	8	8	8	8
44	8	10	9	8	8	8	8	8	8
45	8	9	8,5	8	8	8	8	8	8
46	9	9	9	8	8	8	8	8	8
47	8	8	8	8	8	8	8	8	8
48	7	7	7	5	5	5	5	5	5
49	4	4	4	5	4	4,5	4	4,5	4,5
50	6	5	5,5	5	5	5	5	5	5
51	6	6	6	5	5	5	5	5	5
52	6	4	5	5	5	5	5	5	5
53	5	5	5	5	5	5	5	5	5
54	5	5	5	5	5	5	5	5	5
55	6	5	5,5	5	5	5	5	5	5
56	10	9	9,5	9	9	9	9	9	9
57	10	9	9,5	9	9	9	9	9	9
58	9	8	8,5	8	8	8	8	8	8
59	11	10	10,5	10	10	10	10	10	10
60	6	7	6,5	8	8	8	8	8	8
61	9	9	9	8	8	8	8	8	8
62	9	9	9	8	8	8	8	8	8
63	6	4	5,5	7	7	7	7	7	7
64	8	8	8	7	7	7	7	7	7
65	10	10	10	7	7	7	7	7	7
66	10	11	10,5	8	8	8	8	8	8
67	7	8	7,5	7	7	7	7	7	7
68	10	9	9,5	7	7	7	7	7	7
69	11	11	11	9	9	9	9	9	9
70	11	11	11	10	10	10	10	10	10
71	11	11	11	10	10	10	10	10	10
72	11	11	11	10	10	10	10	10	10
73	5	7	6	5	5	5	5	5	5
74	8	8	8	7	7	7	7	7	7

Tab. V: Einzel- und Mittelwerte der SN- und HAH-Titer ($\log_2$) von 74 einzelnen Feldseren gegen den Massachusetts-Stamm des AIBV. Seren nach Beständen geordnet.

- 1 Titerhöhe bei der ersten Durchführung
- 2: Titerhöhe bei der zweiten Durchführung
- $\bar{x}$ Mittelwert

Seren (Anzahl)	M-41 $\bar{x}$	HAH-Titer $\bar{x}$	H-52 $\bar{x}$	SN-Titer $\bar{x}$
4		10,5		7,5
3		6,8		6,6
4		10,7		10,0
3		6,0		5,3
3		7,0		6,6
6		7,3		6,4
1		10,5		7,0
3		4,5		4,5
3		4,6		4,5
3		10,0		9,0
9		9,8		9,1
2		8,7		8,0
4		8,0		7,~
7		5,1		3,4
3		9,1		8,6
1		10,5		9,0
3		8,3		8,0
3		8,8		7,0
3		9,1		7,3
4		11,0		9,7
.		7,0		6,0

Tab. VI: Mittelwerte der SN- und HAH-Titer ($\log_2$)
von 21 gepoolten Feldseren gegen den
Massachusetts-Stamm des AIBV.

$\bar{x}$: Mittelwert der gepoolten Feldseren

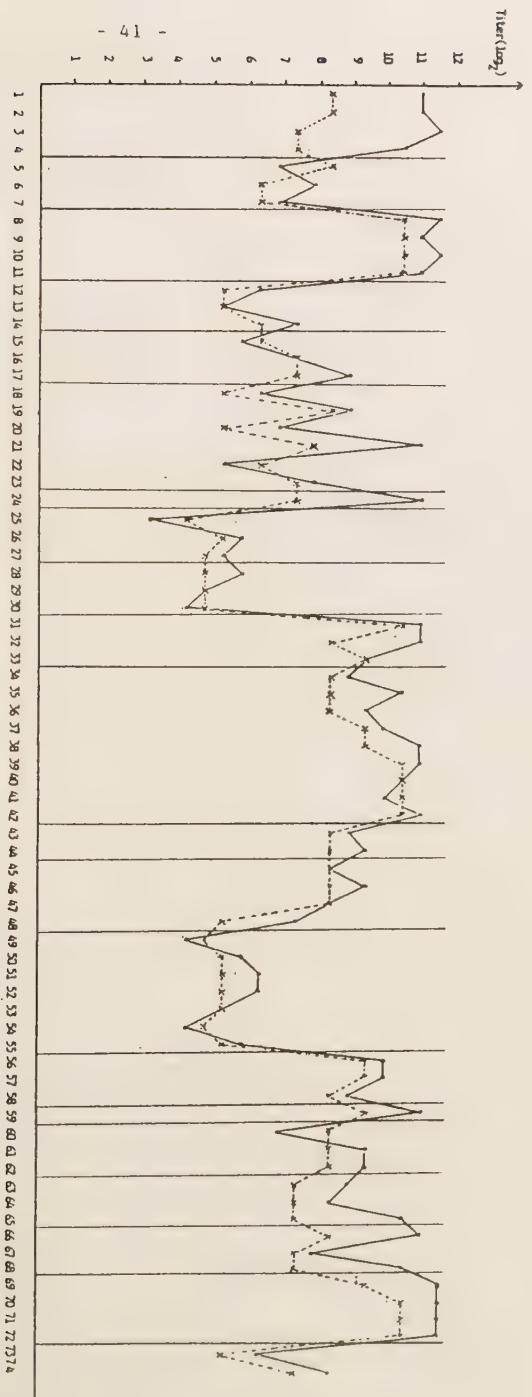


Abb. 1: SN- und HAH-Titer von 74 einzelnen Feldseren gegen den Massachusetts-Stamm des AIBV. Seren nach Beständen geordnet.

HAH: ————— Massachusetts-Stamm M₄₁

SN: x - - - - - Massachusetts-Stamm H₅₂

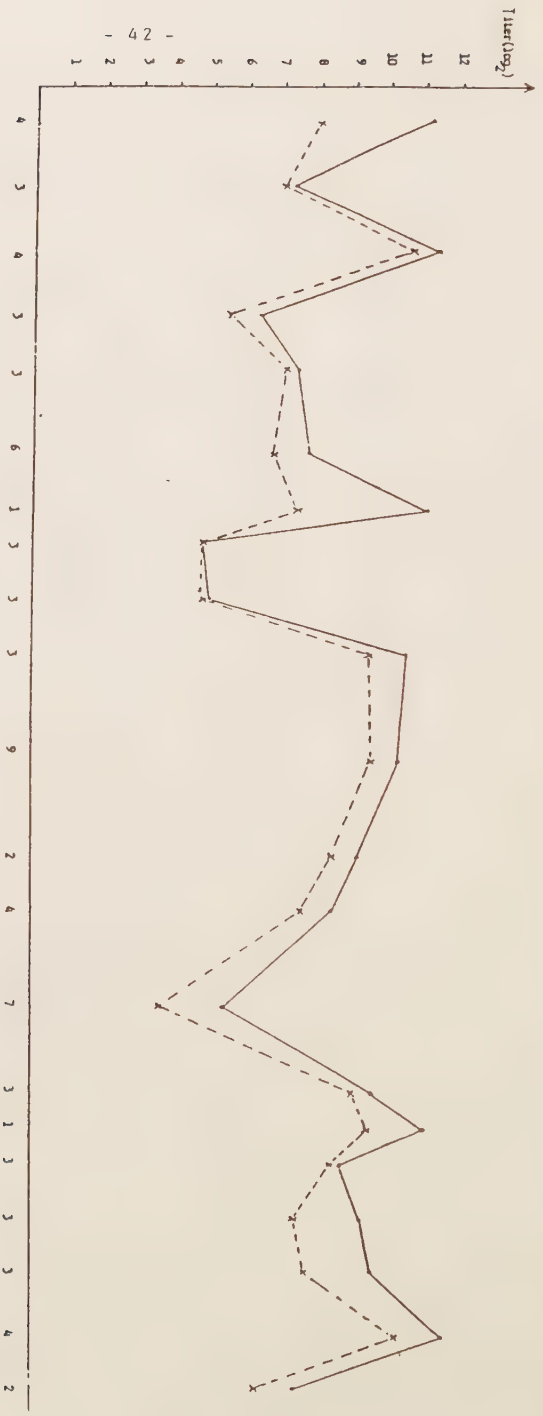
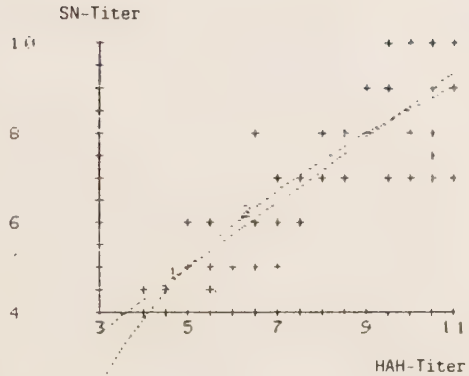


Abb. 2: SN- und HAH-Titer von 21 gepoolten Feldseren
gegen den Massachusetts-Stamm des AIBV.

HAH: ———— Massachusetts-Stamm M₄₁
 SN: x - - - - - x Massachusetts-Stamm H₅₂

Abb. 3:

Statistische Auswertung
der in Tab. V verglich-
enen Werte der SN- und
HAH-Titer von 74 einzel-
nen Feldseren anhand der
Korrelation in einem
Rechnerdiagramm.



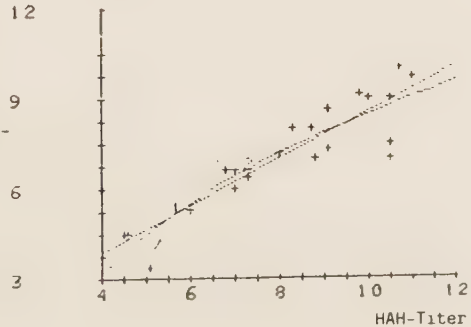
Lineare Regression: $r^2 = 0,762$
 $r = 0,873$

Logarithmische : $r^2 = 0,739$
Kurvenanpassung $r = 0,860$

Abb. 4:

Statistische Auswertung 12
der in Tab. VI verglich-
enen Werte bei gepoolten
Feldseren anhand der Kor- 9
relation in einem Rechner-
diagramm.

SN-Titer



Lineare Regression: $r^2 = 0,810$
 $r = 0,90$

Logarithmische: $r^2 = 0,815$
Kurvenanpassung $r = 0,903$

5.2.1.1. Vergleich der Massachusetts-Viren H_{52} und M_{41}
bei der SN

Tab. VII: Vergleich der AIBV Massachusetts-Stämme H_{52} und M_{41}
bei der SN in Trachealkulturen.

Seren mit hohem AIBV-Antikörper-Titer:	Serum-Nr.	H_{52}	M_{41}
	8	10	10
	31	10	10
	42	10	10
	57	9	10
	72	10	10
Seren mit mittlerem AIBV-Antikörper-Titer:	7	6	5
	16	7	6
	23	7	6
	64	7	6
	74	7	8
Seren mit niedrigem AIBV-Antikörper-Titer:	13	5	4
	25	4	5
	30	5	4
	49	4	5
	73	5	5

In Tabelle VII sieht man, daß sich die SN-Titer der Viren M_{41} und H_{52} im hohen, mittleren und niedrigen Bereich fast nicht voneinander unterscheiden.

5.2.2. HAH-Titer gegen die D-274 Variante im Vergleich
zum SN-Titer gegen die Varianten D-207, D-3128
und D-3896

Tabelle VIII und IX sowie die sich daraus ergebenden graphischen Darstellungen in Abbildung 5 und 6 zeigen die engen Beziehungen der beiden Testverfahren SN und HAH bei Verwendung von D-274 und D-207. Im allgemeinen weichen die Titer um nicht mehr als eine $\log_2$ -Verdünnungsstufe voneinander ab, wie man sowohl bei Verwendung von Einzelseren als auch bei gepoolten Seren sehen kann. Die in den Abbildungen 5 und 6 erkennbaren Beziehungen lassen sich statistisch (Abb. 7 u. 8) durch den Korrelationskoeffizienten von 0,864 bzw. 0,916 bestätigen.

Ein zusätzlich durchgeführter Vergleich von SN und HAH bei Verwendung von D-274-Virus (HAH) und D-3128- sowie D-3896-Virus (SN) zeigt in Tabelle VIII ebenfalls enge Beziehungen der beiden Testverfahren.

Serum (Nr.)	n-274 1	HAH-Titer 2	HAH-Titer x	SNT-Titer 1	SNT-Titer 2	D-207 x	D-3128 x	D-3896 x	Serum (Nr.)	D-274 1	HAH-Titer 2	HAH-Titer x	SNT-Titer 1	SNT-Titer 2	D-207 x	D-3128 x	D-3896 x
1	7	7	7	6	6	6	6	5	38	10	9	4,5	7	7	7	8	6
2	8	7	7,5	6	6	6	6	6	39	11	9	10	7	7	7	8	8
3	9	9	9	7	7	7	8	8	40	10	10	10	7	7	7	6	7
4	10	9	9,5	8	8	8	7	8	41	8	8	8	8	8	8	5	5
									42	11	11	11	9	9	9	9	8
5	5	4	4,5	6	6	6	5	5									
6	6	5	5,5	6	6	6	5	5	43	6	4	5	5	5	5	6	5
7	5	5	5	6	6	6	5	5	44	11	9	10	10	10	10	8	8
8	10	8	9	6	7	6,5	7	6,5	45	5	4	4,5	5	5	5	7	6
9	11	11	11	9	8	8,5	8	8,5	46	5	5	5	5	5	5	5	5
10	10	9	9,5	9	9	9	8	7,5	47	5	4	4,5	4	4	4	4	4
11	11	9	10	9	9	9	8	7,5	48	3	3	3	3	4	4	4	4
12	6	4	5	4	4	4	5	4	49	3	3	3	4	4	4	4	4
13	4	3	3,5	4	4	4	5	4	50	3	3	3	4	4	4	4	4
14	6	4	5	4	4	4	5	4	51	3	3	3	4	4	4	4	4
15	5	5	5	4	4	4	5	4	52	3	3	3	4	4	4	4	4
16	7	8	7,5	7	6	5,5	6	4	53	3	3	3	4	4	4	4	4
17	9	11	10	7	8	7,5	7	4	54	4	3	3,5	4	4	4	4	4
18	4	3	3,5	5	5	5	5	4	55	8	8	8	7	7	7	6,5	6,5
19	8	6	7	6	6	6	6	4	56	7	8	7,5	7	7	7	6,5	6,5
20	6	5	5,5	4	4	4	5	4	57	6	7	6,5	7	7	7	5	5
21	10	8	9	7	6	6,5	6	7	58	5	5	5	6	6	6	5	5
22	4	3	3,5	4	4	4	5	4	59	5	5	5	6	6	6	5	5
23	6	6	6	5	5	5	5	4	60	5	5	5	6	6	6	5	5
24	11	10	10,5	9	9	9	8	7	61	5	5	5,5	5	5	5	5	5
25	5	4	4,5	5	4	4,5	4	4	62	5	5	5	5	5	5	5	5
26	5	3	4	4	4	4	4	4	63	5	5	5,5	5	5	5	5	5
27	3	3	3	4	4	4	4	4	64	5	5	5,5	5	5	5	5	5
28	5	4	4,5	5	4	4,5	4	4	65	5	5	5,5	5	5	5	5	5
29	3	3	3	5	4	4,5	4	4	66	5	5	5,5	5	5	5	5	5
30	2	2	2	4	4	4	4	4	67	5	5	5,5	5	5	5	5	5
31	6	5	5,5	5	5	5	5	6	68	5	5	5,5	5	5	5	5	5
32	6	5	5,5	5	5	5	5	5	69	5	5	5,5	5	5	5	5	5
33	5	5	5	5	5	5	5	5	70	5	5	5,5	5	5	5	5	5
34	7	7	7	5	5	5	5	5	71	5	5	5,5	5	5	5	5	5
35	11	11	11	9	9	9	8	8	72	5	5	5,5	5	5	5	5	5
36	10	9	9,5	6	6	6	8	5	73	5	5	5,5	5	5	5	5	5
37	11	9	10	6	6	6	5	6	74	5	5	5,5	5	5	5	5	5

Tab. VIII: Einzel- und Mittelwerte der SN- und HAH-Titer (log.) von 74 einzelnen feldseren gegen die AIBV-Stämme D-274, D-207, D-3128 und D-3896. Seren nach Beständen geordnet.

- 1: Titerhöhe bei der ersten Durchführung
- 2: Titerhöhe bei der zweiten Durchführung
- 7: Mittelwerte

Seren (Anzahl)	O-274 $\bar{x}$	HAH-Titer $\bar{x}$	O-207 $\bar{x}$	SN-Titer $\bar{x}$
4		8,2		6,7
3		5,0		6,0
4		9,8		8,2
3		4,5		4,0
3		7,5		6,0
6		5,7		5,0
1		10,5		9,0
3		3,6		4,1
3		3,1		4,1
3		5,3		5,0
9		9,5		7,1
		1,1		7,5
4		4,2		4,5
7		3,0		4,0
3		7,3		7,0
1		5,0		6,0
3		6,0		5,7
3		5,5		5,7
3		5,5		5,0
4		7,0		5,5
2		5,5		5,0

Tab. IX: Mittelwerte der SN- und HAH-Titer ($\log_2$)
von 21 gepoolten Feldseren gegen die
AIBV-Stämme O-274 und O-207

$\bar{x}$: Mittelwert der gepoolten Feldseren

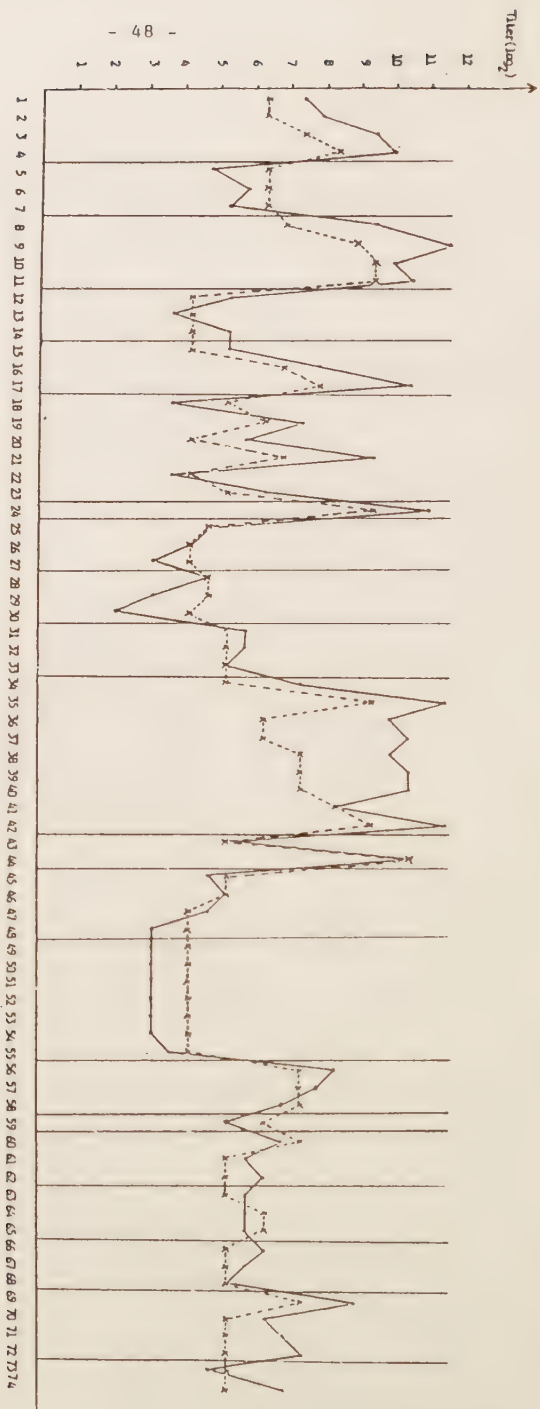


Abb. 5: SN- und HAH-Titer von 74 einzelnen Feldseren gegen die AIBV-Stämme D-274 und D-207. Seren nach Beständen geordnet.

HAH: — AIBV-Stamm D-274
 SN: - - - x AIBV-Stamm D-207

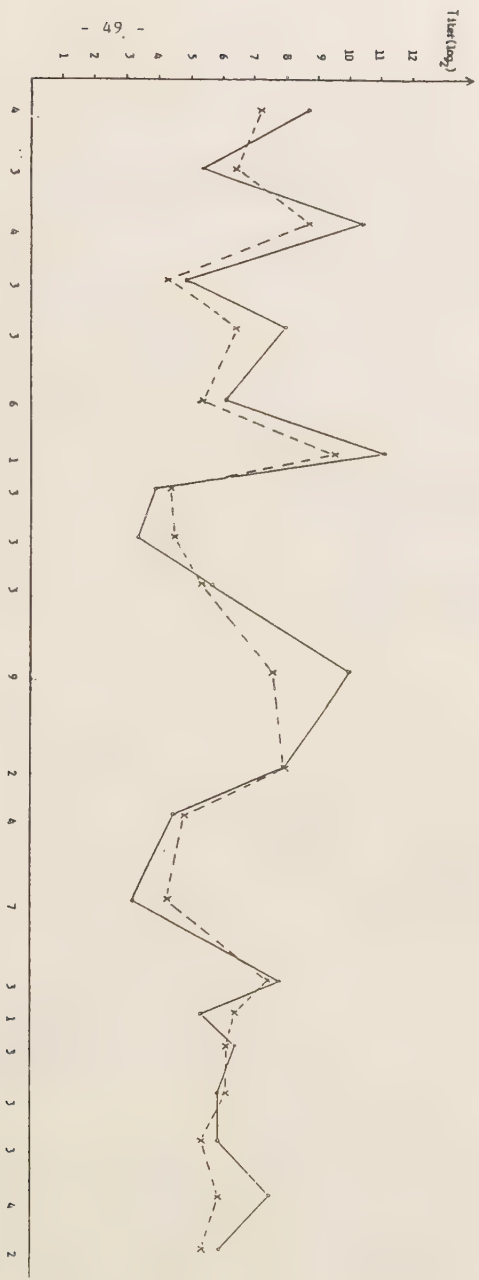
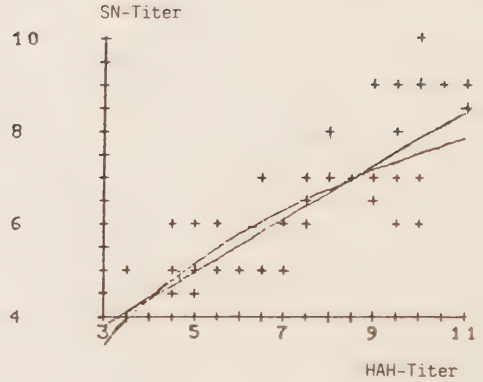


Abb. 6: SN- und HAH-Titer von 21 gepoolten Feldseren
gegen die AIBV-Stämme D-274 und D-207

HAH: —●— AIBV-Stamm D-274
SN: - - - x - - - AIBV-Stamm D-207

Abb. 7:

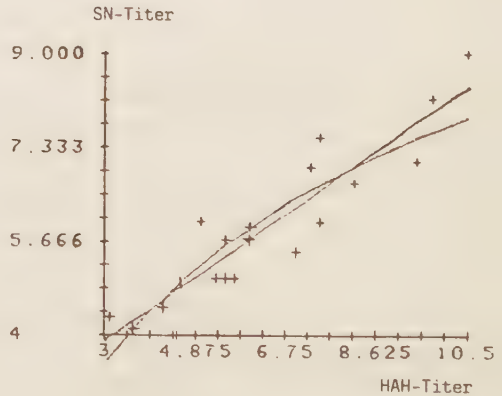
Statistische Auswertung
der in Tab. VIII ver-
glichenen Werte der SN-
und HAH-Titer von 74
einzelnen Feldseren an-
hand der Korrelation in
einem Rechnerdiagramm.



Lineare Regression : $r^2 = 0,747$
 $r = 0,864$
 Logarithmische $r^2 = 0,702$
 Kurvenanpassung : $r = 0,837$

Abb. 8:

Statistische Auswertung
der in Tab. IX verglich-
enen Werte bei gepoolten
Feldseren anhand der Kor-
relation in einem
Rechnerdiagramm



Lineare Regression : $r^2 = 0,839$
 $r = 0,916$
 Logarithmische $r^2 = 0,787$
 Kurvenanpassung : $r = 0,887$

5.2.3. HAH-Titer gegen die D-1466 Variante im Vergleich
zum SN-Titer gegen die D-212 Variante

Tabelle X und XI sowie die sich daraus ergebenden graphischen Darstellungen in Abbildung 9 und 10 zeigen die engen Beziehungen der beiden Testverfahren SN und HAH bei Verwendung von D-1466- und D-212-Virus. Im allgemeinen weichen die Titer um nicht mehr als eine $\log_2$ -Verdünnungsstufe voneinander ab, wie man sowohl bei Verwendung von Einzelseren als auch bei gepoolten Seren sehen kann. Die in Abbildung 9 und 10 erkennbaren Beziehungen lassen sich statistisch (Abb. 11 und 12) durch den Korrelationskoeffizienten von 0,912 bzw. 0,943 bestätigen.

Serum (Nr.)	D-1466 1	HAH-Titer 2 x	D-212 1	SN-Titer 2 x	Serum (Nr.)	D-1466 1	HAH-Titer 2 x	D-212 1	SN-Titer 2 x
1	5	6 5,5	4	4 4	38	9	8 8,5	8	8 8
2	6	6 6	4	4 4	39	11	9 10	9	9 9
3	5	6 5,5	4	4 4	40	7	7 7	6	6 6
4	5	5 5	4	4 4	41	6	8 7	5	5 5
5	6	6 6	5	5 5	42	9	10 9,5	9	9 9
6	7	5 6	5	5 5	43	6	6 6	6	6 6
7	6	5 5,5	5	5 5	44	9	8 8,5	7	7 7
8	7	7 7	7	7 7	45	6	6 6	5	5 5
9	10	9 9,5	9	9 9	46	4	5 4,5	5	5 5
10	9	9 9	9	9 9	47	5	5 5	5	5 5
11	9	9 9	8	8 8	48	5	6 5,5	5	5 5
12	8	7 7,5	7	7 7	49	4	4 4	5	4 4,5
13	5	5 5	5	5 5	50	5	5 5	5	4 4,5
14	10	7 8,5	8	8 8	51	6	5 5,5	5	4 4,5
15	8	7 7,5	6	6 6	52	5	5 5	5	4 4,5
16	10	9 9,5	9	9 9	53	6	7 6,5	5	4 4,5
17	10	10 10	9	9 9	54	6	5 5,5	5	4 4,5
18	6	7 6,5	6	6 6	55	6	5 5,5	5	4 4,5
19	7	8 7,5	6	6 6	56	6	7 6,5	5	5 5
20	6	6 6	6	6 6	57	7	8 7,5	5	5 5
21	7	8 7,5	5	5 5	58	6	5 5,5	5	5 5
22	5	5 5	5	5 5	59	6	5 5,5	5	5 5
23	6	7 6,5	5	5 5	60	5	5 5	5	5 5
24	11	10 10,5	9	9 9	61	4	5 4,5	5	5 5
25	6	5 5,5	5	5 5	62	4	4 4	4	4 4
26	8	6 7	7	7 7	63	5	4 4,5	5	5 5
27	5	6 5,5	5	5 5	64	6	5 5,5	5	5 5
28	5	5 5	4	4 4	65	5	6 5,5	5	5 5
29	5	4 4,5	4	4 4	66	6	4 5	5	5 5
30	5	5 5	4	4 4	67	6	5 5,5	5	5 5
31	6	5 5,5	5	5 5	68	6	6 6	5	5 5
32	8	6 7	7	7 7	69	6	6 6	5	5 5
33	5	6 5,5	5	5 5	70	7	6 6,5	5	5 5
34	7	6 6,5	5	5 5	71	5	6 5,5	5	5 5
35	9	9 9	8	8 8	72	7	6 6,5	5	5 5
36	7	9 8	8	8 8	73	4	4 4	4	4 4
37	7	7 7	5	5 5	74	4	4 4	4	4 4

Tab. X: Einzel- und Mittelwerte der SN- und HAH-Titer ($\log_2$) von 74 einzelnen Feldseren gegen die AIBV-Stämme D-1466 und D-212, Seren nach Beständen geordnet.

1: Titerhöhe bei der ersten Durchführung

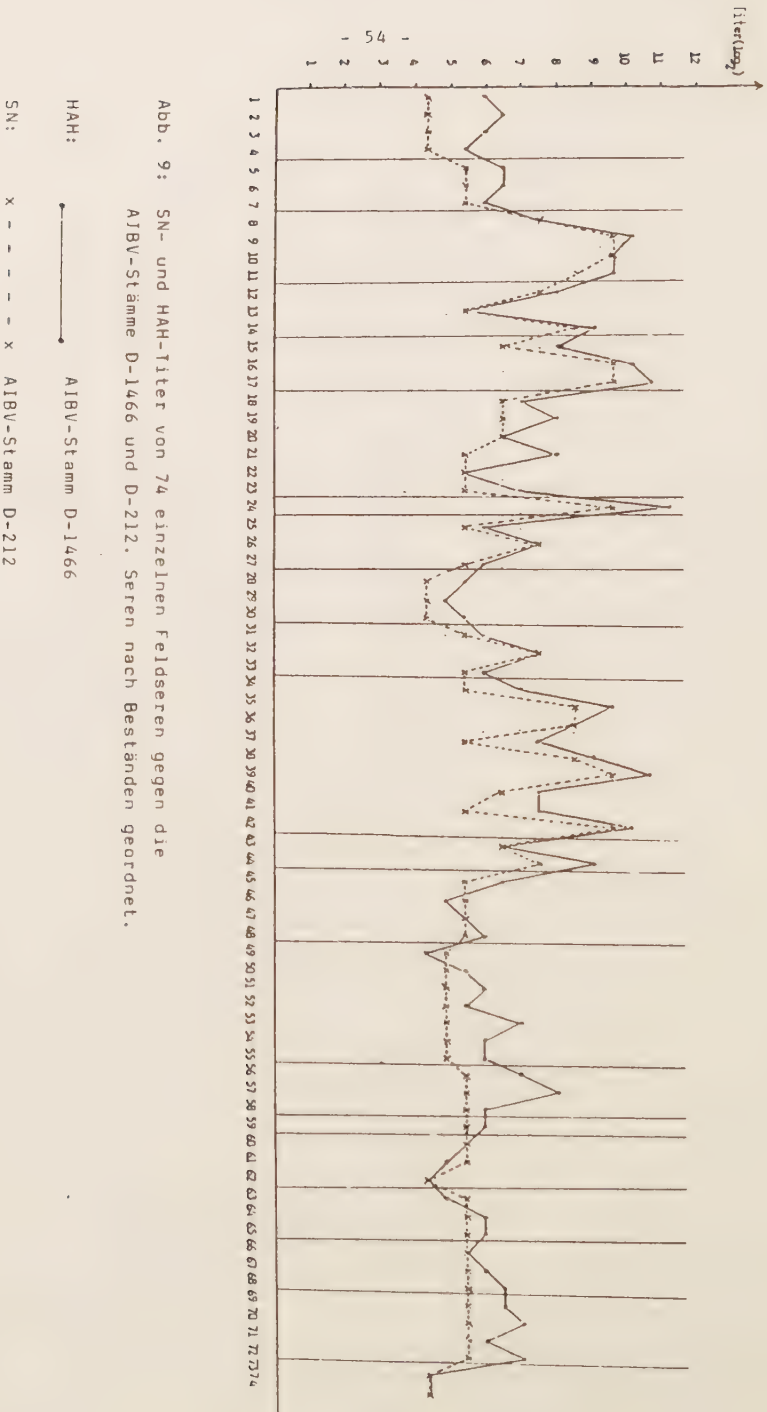
2: Titerhöhe bei der zweiten Durchführung

x: Mittelwert

Seren (Anzahl)	D-1466 $\bar{x}$	HAH-Titer $\bar{x}$	D-212 $\bar{x}$	SN-Titer $\bar{x}$
4		5,5		4,0
3		5,8		5,0
4		8,6		8,2
3		7,0		6,6
3		9,0		8,0
6		6,5		6,5
1		10,5		9,0
3		6,0		5,7
3		4,8		4,0
3		6,0		5,7
9		8,0		7,0
2		7,2		6,5
4		5,2		5,0
7		5,2		4,5
3		6,5		5,0
1		5,5		5,0
3		4,5		4,7
3		5,7		5,0
3		5,5		5,0
4		6,1		5,0
2		4,0		4,0

Tab. XI: Mittelwerte der SN- und HAH-Titer ($\log_2$)
von 21 gepoolten Feldseren gegen die AIBV-Stämme
D-1466 und D-212.

$\bar{x}$: Mittelwert der gepoolten Feldseren



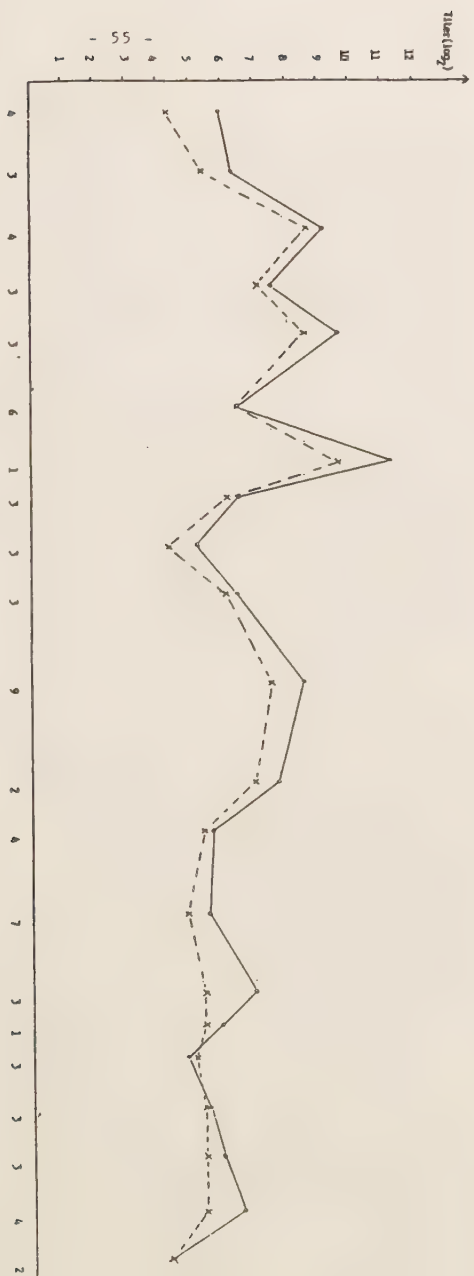
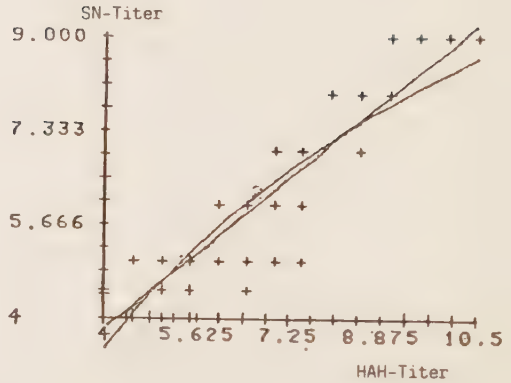


Abb. 10: SN- und HAH-Titer von 21 gepoolten Feldseren
gegen die AIBV-Stämme D-1466 und D-212.

HAH: —●— AIBV-Stamm D-1466

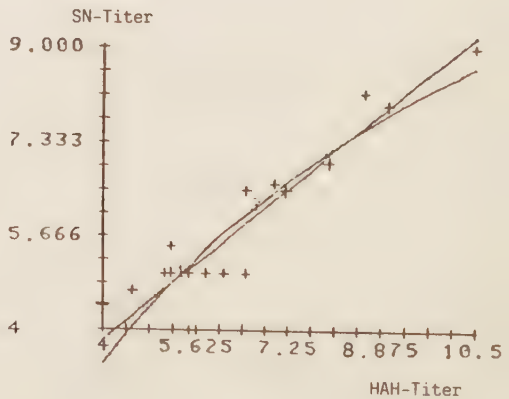
SN: - - - x AIBV-Stamm D-212

Abb. 11:
Statistische Auswertung
der in Tabelle X ver-
glichenen Werte der SN-
und HAH-Titer von 74
einzelnen Feldseren an-
hand der Korrelation in
einem Rechnerdiagramm



Lineare Regression : $r^2 = 0,832$
 $r = 0,912$
 Logarithmische $r^2 = 0,785$
 Kurvenanpassung : $r = 0,886$

Abb. 12:
Statistische Auswertung
der in Tabelle XI ver-
glichenen Werte bei ge-
poolten Feldseren an-
hand der Korrelation in
einem Rechnerdiagramm.



Lineare Regression : $r^2 = 0,890$
 $r = 0,943$
 Logarithmische $r^2 = 0,862$
 Kurvenanpassung : $r = 0,928$

5.3. Kreuzhämagglutinationstest⁺ der AIBV-Stämme H₅₂,
M₄₁, D-274 und D-1466

Tab. XII: Ergebnisse des Kreuzhämagglutinationstests
mit den Virusstämmen H₅₂, M₄₁, D-274, D-1466
und den homologen und heterologen Antiseren.

Antiseren	AIBV-HA-Antigen		
	M ₄₁	D-274	D-1466
M ₄₁	8,5	3,5	3,0
D-274	6,0	9,0	4,5
D-1466	5,0	6,0	8,5
H ₅₂	8,5	1,0	3,0

⁺ Die HAH wurden 5 mal durchgeführt, wobei die HAH-Titer zwischen 1 und 3 Stufen schwankten.

Tabelle XII zeigt die HAH-Titer der homologen Antiseren sowie von Antiserum H₅₂ gegen die AIBV-Stämme M₄₁, D-274 und D-1466. Eine Prüfung gegen H₅₂-HA-Antigen war nicht möglich, da unser H₅₂-Stamm kein zufriedenstellendes HA-Antigen produzierte.

6. Diskussion

Bei den vorliegenden Untersuchungen sollte die Vergleichbarkeit von HAH und SN bei den für uns wichtigen AIBV-Serotypen überprüft werden.

Wie die Tabellen III, IV, V, VI, VIII, IX, X und XI sowie die Schaubilder Abb. 1 bis Abb. 12 zeigen, sind die Ergebnisse beider Verfahren bei den geprüften Isolaten M_{41}/H_{52} , D-274/D-207 und D-1466/D-212 weitgehend übereinstimmend, so daß die Erfahrungen von Alexander et al (1976), Lashgari und Newman (1984), King und Hopkins (1984) und Lütticken und Cornelissen (1984) auch mit diesen AIBV-Stämmen bestätigt werden können. Dadurch könnte in Zukunft bei diesen Serotypen die Notwendigkeit des zeitlich und arbeitstechnisch wesentlich aufwendigeren Serumneutralisationstests, wie er am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt in Aulendorf jahrelang durchgeführt wurde, entfallen. Nur in wenigen Ausnahmefällen zeigen sich jedoch Abweichungen um bis zu 4 Titerstufen. Eine der Ursachen könnte ein Titerabfall bei mehrmaligem Auftauen und Einfrieren der Seren sein. Auch Fehler bei der Durchführung der HAH und SN sind nie ganz auszuschließen. Besonders bei der HAH bestehen gelegentlich Schwierigkeiten bei der Ablesung, die nicht so einfach ist, wie bei der HAH mit dem Newcastle Disease Virus. Es muß grundsätzlich bei einem Neigungswinkel der Mikrotiterplatte um 45 Grad eine Fließprobe gemacht werden. Auch muß vor jeder HAH das HA-Antigen erneut auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellt werden, da das AIB-HA-Antigen sehr licht- und wärmeempfindlich ist und somit ständig mit einem Titerabfall gerechnet werden muß. Auch muß daran gedacht werden, daß die Massachusetts-Viren M_{41} und H_{52} , die Hollandvariante D-274 und D-207 sowie die Hollandvariante D-1466 und D-212 zwar ähnlich (Kouwenhoven et al, 1983; Davelaar et al, 1984; Cegla und Kaleta, 1984), aber nicht serologisch gleich sind, also nur stark miteinander korrelieren, so daß gelegentlich Unterschiede der HAH-Titer um 2 - 3 Stufen zu erwarten sind.

Auf die Hollandvariante D-274 anstatt D-207 sowie D-1466 anstatt D-212 bei der HA-Antigenherstellung kann jedoch nicht verzichtet werden, da mit den AIBV D-207 und D-212 bisher kein hämagglutinierendes AIBV-HA-Antigen hergestellt werden konnte und sie somit für die HAH nicht verwendbar sind.

Das Massachusetts-Virus M₄₁ wird dem H₅₂ vorgezogen, weil es wesentlich höhere HA-Titer liefert. Bei der SN sind beide sehr ähnlich, wie sich aus eigenen Versuchen ergibt (Tab. VII). Die HAH ist zuverlässig, wesentlich einfacher und schneller als die SN. Bei der Herstellung und Lagerung ergeben sich jedoch noch einige Schwierigkeiten bezüglich der Bebrütungsdauer der embryonierten Eier, der PLC 1 sowie der Lagerung des HA-Antigens. Besondere Schwierigkeiten hatten wir mit einer Charge PLC 1, mit der kein verwendbares HA-Antigen hergestellt werden konnte. Die Ursachen dafür sind nicht bekannt, es wäre jedoch denkbar, daß die Phospholipase mit Proteasen verunreinigt war, welche die Peplomeren schädigten. Nach Cavanagh (1983) bestehen diese Peplomeren aus glycolysierten Polypeptiden.

Die meisten Schwierigkeiten ergaben sich bei der Herstellung des HA-Antigens. Unter den Laborverhältnissen des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf schien sich die Ultrazentrifugation am besten zu eignen. Da die HAH bei der AIB aber oder gerade für technisch weniger gut ausgestattete Labors von Interesse ist, wurden auch technisch weniger aufwendigere Verfahren überprüft. Dazu gehörte die Viruspräzipitation mit PEG 6000 und die Dialyse mit einer semipermeablen Membran und PEG 20000. Wäre ein gebrauchsfertiges HA-Antigen im Handel erhältlich, so ließe sich diese HAH in allen Labors uneingeschränkt durchführen, was die bisher aufwendige AIB-Serodiagnostik außerordentlich erleichtern würde.

7. Zusammenfassung

Es wurden die Vergleichbarkeit von Serumneutralisation (SN) und Hämagglutinationshemmung (HAH) mit den Stämmen Massachusetts, D-274/D-207 und D-1466/D-212 des Virus der Aviären Infektiösen Bronchitis (AIBV) sowie Methoden der Herstellung und Lagerung des hämagglutinierenden (HA) Antigens geprüft.

Die Ergebnisse zeigen, daß SN- und HAH-Titer mit allen geprüften AIBV-Stämmen eng miteinander korrelieren und im allgemeinen um nicht mehr als eine $\log_2$ -Verdünnungsstufe voneinander abweichen. Der Korrelationskoeffizient liegt in allen Fällen über 0,85 und ist somit statistisch hochsignifikant.

Bei HA-Antigen bildenden AIBV-Stämmen ist die aufwendige SN für stammspezifische Untersuchungen daher durch die wesentlich einfachere HAH ersetzbar.

Für die Viruskonzentrierung erwies sich die Ultrazentrifugation als am geeignetsten. Die Lagerfähigkeit des HA-Antigens zeigte je nach verwendetem Virusstamm erhebliche Unterschiede, die von praktischer Bedeutung sind.

Comparison of different serotypes of the Avian Infectious Bronchitis virus using serum neutralisation and haemagglutination inhibition.

Summary

A comparison was made between serum neutralisation (SN) and haemagglutination inhibition (HI), using the Avian Infectious Bronchitis Virus (AIBV) strains Massachusetts, D-274/D-207 and D-1466/D-212. Furthermore methods for the production and storage of the haemagglutinating (HA) antigen were investigated.

The results show that SN and HI titers with all AIBV strains tested were closely correlated and generally did not deviate by more than one $\log_2$ dilution step. The correlation coefficient was $> 0,85$ with all strains and was statistically highly significant. Thus, with HA antigen producing strains so AIBV, the time-consuming SN for strain-specific investigations can be replaced by the much simpler HI test.

Virus concentration was best achieved by ultracentrifugation. Storage conditions varied considerably among strains, which is of practical significance.

Ensayo comparativo de varios serotipos del virus de la bronquitis infecciosa aviar usando las técnicas de neutralización de suero e inhibición de hemaglutinación.

Resumen

Se compararon los resultados de neutralización de suero (SN) e inhibición de hemaglutinación (HAH) usando las cepas del virus de bronquitis infecciosa aviar (AIBV) Massachusetts, D-274/D-207 y D-1466/D-212, además los métodos de producción y almacenaje de los antígenos hemaglutinantes.

Resulta que los títulos de SN y HAH tienen una correlación muy estrecha y no se difieren más que un paso de dilución logarítmico en base de dos. El coeficiente de correlación supera en todos los casos el 0,85 y es por eso altamente significativo. Evaluando la especificidad serotípica se puede remplazar la SN gastosa por la HAH que es mucho más sencilla, siempre cuando se trata de cepas formantes antígeno hemaglutinante.

El método más adecuado para la concentración del virus es la ultracentrifugación. La conservación de antígeno hemaglutinante depende sumamente de la cepa viral de producción y es de importancia práctica.

8. Literaturverzeichnis

- Alexander, D. J.; Bracewell, C. D.; Gough, R. E. (1976)
Preliminary evaluation of the haemagglutination and
haemagglutination inhibition tests for avian infec-
tious bronchitis virus
Avian Pathol. 5, 125 - 134
- Alexander, D. J.; Chettle, N. J. (1977)
Procedures for the haemagglutination and the haem-
agglutination inhibition tests for avian infectious
bronchitis virus
Avian Pathol. 6, 9 - 17
- Beard, C. W.; Hopkins, S. R.; Hammond, J. (1975)
Preparation of Newcastle disease virus haem-
agglutination-inhibition test antigen
Avian Dis. 19, 692 - 699
- Bingham, R. W.; Madge, M. H.; Tyrrell, D. A. J. (1975)
Haemagglutination by avian infectious bronchitis
virus - a coronavirus
J. Gen. Virol. 28, 381 - 390
- Biswal, N.; Nazerian, K.; Cunningham, C. H. (1966)
A haemagglutinating fraction of infectious
bronchitis virus
Am. J. Vet. Res. 27, 1157 - 1167
- Bracewell, C. D. (1982)
Infectious bronchitis haemagglutination inhibition
test
Vet. Rec. 111, 67

Brown, A. J.; Bracewell, C. D. (1985)

Application of the haemagglutination inhibition test
to typing of infectious bronchitis virus
Vet. Rec. 116, 47 - 48

Brown, W. E.; Schmittie, S. C.; Foster, J. W. (1962)

A tannic acid modified haemagglutination test for
infectious bronchitis of chickens
Avian Dis. 6, 99 - 106

von Bülow, V. (1967 b)

Infektiöse Bronchitis der Hühner IV. Charakterisierung
eines neuen Feldstammes (IBV 10)
Zb. Vet. Med. B. 14, 151 - 162

Cavanagh, D. (1983)

Coronavirus IBV: Further evidence that the surface
projections are associated with two glycopolypeptides
J. gen. Virol., 64, 1787 - 1791

Cavanagh, D.; Darbyshire, J. H.; Davis, P.; Peters, R. W. (1984)

Induction of humoral neutralising and haemagglutination-
inhibition antibody by the spike protein of avian
infectious bronchitis virus
Avian Pathol. 13, 573 - 583

Cegla, C. (1986)

Untersuchungen zur Epizootiologie und Pathogenität der
sogenannten Variantstämme des Virus der Infektiösen
Bronchitis (IBV) des Huhnes sowie zur Immunität nach
Einsatz eines Formalin inaktivierten Ölemulsionsimpf-
stoffes mit den IB-Virus-Stämmen M-41, D-274 und D-1466
Vet. Diss., Gießen

Cegla, C.; Kaleta, E. F. (1984)

Vorkommen von Erregervarianten der Infektiösen
Bronchitis des Huhnes und derzeitiger Stand der
Immunprophylaxe
29. Fachgespräch über Geflügelkrankheiten,
Hannover, 25.10.84

Cherry, J. D.; Taylor-Robinson, D. (1970)

Large- quantity production of chicken embryo tracheal
organ cultures and use in virus and mycoplasma studies
Appl. Microbiol. 19, 658 - 662

Chulan U.; Ibrahim, L. A. (1982)

The use of the haemagglutination inhibition test for
monitoring avian infectious bronchitis infections
Recent Advances in Poultry Disease Control, Continuing
Education Programme in Animal Health and Production, 1982

Colwell, W. M.; Lukert, P. D. (1969)

Effects of avian infectious bronchitis (IBV) on tracheal
organ cultures
Avian Dis. 13, 888 - 894

Cook, J. K. A.; Darbyshire, J. H.; Peters, R. W. (1976)

The use of chicken tracheal organ cultures for the iso-
lation and assey of avian infectious bronchitis virus
Arch. Vir. 50, 109 - 118

Corbo, L. J.; Cunningham, C. H. (1959)

Haemagglutination by trypsin-modified infectious
bronchitis virus
Am.J. Vet. Res. 20, 876 - 883

Darbyshire, J. H.; Rowell, J. K.; Cook, J. K. A.; Peters, R. W.
(1979)

Taxonomic studies on strains of avian infectious bronchitis virus using neutralisation tests in tracheal organ cultures

Arch. Virol. 61, 227 - 238

Davelaar, F. G.; Kouwenhoven, B.; Burger, A. G. (1984)

Occurrence and significance of infectious bronchitis virus variant strains in egg and broiler production in the Netherlands

Vet. Quart. No. 3, 114 - 120

Dawson, P. S.; Gough, R. E. (1971)

Antigenic variation in strains of avian infectious bronchitis virus

Arch. Ges. Virusforsch. 34, 32 - 39

Dulbecco, R.; Vogt, M.; Strickland, A. G. R. (1956)

A study of the basic aspects of neutralisation of two animal viruses, western equine encephalitis virus and poliomyelitis virus

Virology 2, 162 - 205

Dutta, S. K. (1975)

Morphological changes of chicken tracheas and tracheal organ cultures infected with avian infectious bronchitis virus studied in scanning electron microscope

Avian Dis. 19, 429 - 436

Hatcher, J. A.; Skeeles, J. K.; Blore, P. J.; Story, J. D. (1983)

Comparison of the haemagglutination-inhibition test with the constant-virus diluting-serum microneutralization test for detecting antibody to avian infectious bronchitis virus

Avian Dis. 27, 1157 - 1160

Holmes, H. C.; Finney, P. M. (1985)

Haemagglutination inhibition antibody titres in
chickens vaccinated with infectious bronchitis
virus vaccines

Vet. Rec. 116, 587 - 588

Johnson, R. B.; Marquardt, W. W. (1975)

The neutralising characteristics of strains of in-
fectious bronchitis virus as measured by the constant-
virus variable-serum method in chicken tracheal cultures
Avian Dis. 19, 82 - 90

Jungherr, E. L.; Terrell, N. L. (1948)

Naturally acquired passive immunity to infectious
bronchitis in chicks

Am. J. Vet. Res. 9, 201 - 205

King, D. J. (1984)

Observation on the preparation and stability of
infectious bronchitis virus haemagglutination
antigen from virus propagated in chicken embryos
and chicken kidney cell cultures

Avian Dis. 28, 504 - 513

King, D. J.; Hopkins, S. R. (1983)

Evaluation of the haemagglutination-inhibition test
for measuring the response of chickens to avian
infectious bronchitis virus vaccination

Avian Dis. 27, 100 - 112

King, D. J.; Hopkins, S. R. (1984)

Rapid serotyping of infectious bronchitis virus
isolates with the haemagglutination-inhibition test
Avian Dis. 28, 727 - 733

Kouwenhoven, B.; Davelaar, F. G.; Burger, A. G.; Lütticken, D.
(1983)

Significance of variant IB serotypes in the Netherlands

Proc. 66 Dis. Prev. and Control in Poultry Prod.

Aug. 31-Sept 2, 1983 Sydney

Lashgari, M. S.; Newman, J. A. (1982)

Preparing haemagglutination antigen from isolates
of infectious bronchitis virus

Avian Dis. 26, 508 - 519

Lashgari, M. S.; Newman, J. A. (1984)

Determination of the antigenic relationship within
the Massachusetts (M⁴¹) type of infectious bronchitis
virus using the haemagglutination-inhibition test

Avian Dis. 28, 444 - 452

Locher, M. (1983)

Vergleichende serologische Untersuchungen von Impfstämmen und süddeutschen Feldisolaten des Virus der infektiösen Bronchitis der Hühner

Vet. Diss., München

Lukert, P. D. (1973)

Avian infectious bronchitis virus. Characteristics
of an inhibitor found in serum

Arch. Ges. Virusforsch. 40, 93 - 104

Lukert, P. D. (1975)

Infectious bronchitis in isolation and identification
of avian pathogens

Am. Assoc. Avian Pathologists S. 182 - 188

Lütticken, D.; Cornelissen, D. R. W. (1984)

Use of the haemagglutination inhibition test for antibodies to avian infectious bronchitis variant strains.

Proc. and Abstr. 34, XVII World' Poultry Confer.
Helsinki, Finl. 8. - 12. Aug.

Mac Pherson, J.; Feest, A. (1978)

Some observations on the value of the infectious
bronchitis haemagglutination inhibition test in the
field

Avian Pathol. 7, 337 - 347

Marius, V.; Guittet, M.; Bennejean, G. (1982)

Evaluation de l'immunité post-vaccinale bronchite
infectieuse chez des volailles élevées convention-
nellement - étude comparée de quatre techniques
serologiques

Avian Pathol. 11, 195 - 211

Mayr, A.; Bachmann, P. A.; Bibrack, B.; Wittmann, G. (1977)

Virologische Arbeitsmethoden, Band II S. 207 - 322,
457 - 534 1. Aufl. 1977,
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New-York

Mohanty, S. B.; Devolt, M. M.; Faber, J. E. (1964)

A fluorescent antibody study of infectious
bronchitis virus

Poult. Sci. 43, 179 - 182

Monreal, G.; Bauer, H. J.; Wiegmann, J. (1985)

Comparison of the enzyme-linked immunosorbent assay
(ELISA), haemagglutination inhibition test and agar gel
precipitation test for detection of antibodies to avian
infectious bronchitis virus

Avian Pathol. 14, 421 - 439

Poli, G.; Rampin, I.; Toniolo, A.; Masciatelli, M. E. (1982)

Indagini sull'attività emoagglutinante del virus
della bronchite infettiva aviaria indotta dal
trattamento con fosfolipasi C
Clin. Vet., 105, 88 - 97

Reed, L. J.; Muench, H. (1938)

A simple method for estimating fifty percent end-
points
Am. J. Hyg. 27, 493 - 497

van Roeckel, H. (1942)

Proc. 15th N. E. Conf. Lab. Wkrs. Pullorum
Dis. Contr., Farmdale L. I.
zitiert nach Darbyshire, J. H. (1981)
Immunity to avian bronchitis virus
Avian Immunol., Edingburgh, Brit. Poult. Sci. Ltd.

Shunsuke, Y.; Kazunari, S.; Shigemi, A. (1985)

Appearance of haemagglutinability of infectious
bronchitis virus following in vitro and in vivo
tracheal passages
Zbl. Vet. Med. 32, 736 - 742

Vasington, P. J.; Laffer, N. C.; Holst, A. P.; De Volt, H. H.
(1963)

Preliminary studies on the technique of passive
haemagglutination with the infectious bronchitis
virus of chickens
Poult. Sci. 42, 634 - 636

Matt, R. G.; Mac Pherson, I. (1980)

Freeze-dried infectious bronchitis haemagglutinating
antigen
Vet. Rec. 106, 467

Woernle, H. (1966)

The use of the Agar-Gel Diffusion Technique in the
Identification of Certain Avian Virus Diseases
Veterinarian 4, 17 - 28

Herrn Professor Dr. J. Kösters danke ich herzlich für das Entgegenkommen, mit der er meine Arbeit angenommen und mit wertvollen Hinweisen für die Methodik unterstützt hat.

Herrn Professor Dr. E. F. Kaleta, Institut für Geflügelkrankheiten, Universität Gießen, danke ich für die freundliche Überlassung von Virusisolaten.

Frau B. Schemera und Herrn Dr. C. Cegla, Institut für Geflügelkrankheiten, Universität Gießen, danke ich für ihre Ratschläge.

Herrn Ltd. Vet. Dir. Dr. B. Müller, Leiter des Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamtes Aulendorf, danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit durch die großzügige Bereitstellung aller notwendigen Einrichtungen am Untersuchungsamt.

Herrn Dr. J. E. Lohr, Aulendorf, danke ich für die Themastellung sowie die Überlassung der Viren und Seren und bin ihm besonders verbunden für die vielfältige wissenschaftliche Anleitung und die angenehme Zusammenarbeit.

Herrn DVR Dr. R. Adam, Aulendorf, und der Firma A. Weiß, Vermehrungszucht GmbH, 7959 Kirchberg/Iller, danke ich für die Bereitstellung männlicher Eintagsküken.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeitern der virologischen Abteilung am Untersuchungsamt Aulendorf für ihre geduldige Hilfe bei den umfangreichen Versuchsdurchführungen.

Die vorliegende Arbeit wurde von der Tierseuchenkasse Baden-Württemberg freundlicherweise finanziell unterstützt.

Lebenslauf

19.03.1955	geboren als Sohn der Eheleute Paul Kaufhold und Frau Renate in Pfullendorf, Kreis Sigmaringen
1962 - 1966	Volksschule in Pfullendorf
1966 - 1970	Progymnasium in Pfullendorf
1970 - 1971	Gymnasium in Messkirch
1971 - 1975	Wirtschaftsgymnasium in Sigmaringen
Mai 1975	hier Abitur
September 1975 - September 1979	Wehrdienst als Zeitsoldat
WS 1979/80 - WS 1984/85	Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
August 1985	Staatsexamen
seit August 1985	Arbeit an vorliegender Dissertation am Staatlichen Tierärztlichen Untersuchungsamt Aulendorf
21.05.1986	Eheschließung mit Frau Anneliese Schmid aus Aach-Linz

